

CAMILA TAINAH DA SILVA

**ESTUDO DA REGULAÇÃO DO PROMOTOR DA METALOPROTEASE-2
POR METILAÇÃO DO DNA E SUA CORRELAÇÃO COM DADOS
IMUNOHISTOQUÍMICOS E CLÍNICO-PATOLÓGICOS EM PACIENTES COM
CÂNCER DE MAMA DE CURITIBA-PR**

**CURITIBA
2010**

CAMILA TAINAH DA SILVA

**ESTUDO DA REGULAÇÃO DO PROMOTOR DA METALOPROTEASE-2
POR METILAÇÃO DO DNA E SUA CORRELAÇÃO COM DADOS
IMUNOHISTOQUÍMICOS E CLÍNICO-PATOLÓGICOS EM PACIENTES COM
CÂNCER DE MAMA DE CURITIBA-PR**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, área de concentração em Patologia, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

Orientadora:
Profª Dra. Giseli Klassen

Co-orientadora:
Profª Dra. Karin Braun-Prado

**CURITIBA
2010**

**Dedico este trabalho aos meus
pais, Salete Patel e Idelfonso
Pereira da Silva, pelo carinho e
apoio que deram em todos os
momentos da minha vida.**

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Prof. Dra. Giseli Klassen, pela oportunidade de aprendizado, crescimento pessoal e profissional. Por ter aberto as portas do seu laboratório e por ter confiado na minha capacidade. Mesmo nos vários momentos de dificuldades, não abriu mão de fazer sempre o melhor.

À minha co-orientadora, Prof. Dra. Karin Braun-Prado, pelas valiosas dicas e correções no decorrer do trabalho. Obrigada por sua presença leve e bem humorada.

Ao programa REUNI, do governo federal, pela bolsa de estudos concedida.

Ao curso de Pós Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia e à coordenadora do curso, Prof. Dra. Edilene de C. Alcântara por todo apoio.

Ao Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer pelas linhagens celulares cedidas.

Ao Laboratório de Citogenética Humana e Oncogenética do Departamento de Genética do setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná pelo fornecimento das amostras tumorais utilizadas neste trabalho, especialmente aos responsáveis pelo laboratório, Dr. Iglénir João Cavalli e Dra. Enilze S. F. Ribeiro, pela disponibilidade de informações sobre as amostras tumorais, e seus alunos, pela disponibilidade e ajuda sempre que necessário.

Ao Dr. Rubens e sua equipe, pelo fornecimento dos tumores primários de mama bem como dos dados clínicos das pacientes.

Ao Dr. Fábio de Oliveira Pedrosa e Prof. Dr. Emanuel Maltempi de Souza pelo suporte financeiro através da participação no projeto Milênio. E também aos alunos do laboratório de Fixação Biológica de Nitrogênio e Biologia Molecular, no Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular pela disponibilidade de equipamentos e laboratórios durante a realização deste trabalho.

Ao laboratório de Patologia Experimental da Universidade Pontifícia Católica do Paraná (PUC-PR) pelo apoio na realização da técnica de imunohistoquímica deste trabalho, bem como da responsável pelo laboratório, Dra. Lucia de Noronha que auxiliou em todas as etapas da imunohistoquímica, desde a coleta do material nos hospitais até sua classificação final. Às biólogas Marina Luise Viola Camargo de Azevedo e Ana Paula Camargo Martins pelo auxílio na realização da técnica, por todo o tempo e paciência que me prestaram e também às conversas informais, sempre incentivadoras, e amizade.

À Prof. Dra. Paula Cristina Rodrigues por abrir a minha mente e coração para o caminho da ciência. Por ter sido minha orientadora de iniciação científica e monitoria e ter aberto várias oportunidades importantes no meu desenvolvimento acadêmico. Por sempre confiar em mim e em minhas

capacidades. Pelo apoio, pelas conversas e desabafos, por me ouvir, por tudo que já fez por mim. Considero-a praticamente o meu anjo da guarda.

Às Profs. Dra. Giseli Klassen, Dra. Lia Nakao e Dra. Karin Braun-Prado por me orientarem na realização das atividades de prática em docência.

À banca avaliadora deste trabalho, Dra. Giseli Klassen, Dra. Lúcia de Noronha e Dra. Fabiane Rego pela leitura e dedicação a este trabalho, pelas dicas e correções.

Ao Valter A. Baura pela disponibilidade incondicional de auxílio na realização de experimentos, pelas várias dicas prestadas, e também pelos momentos de descontração e amizade. Suas palavras de incentivo foram muito importantes em diversos momentos nestes últimos dois anos.

Dna. Roseli, sempre tão prestativa e simpática, por todos os materiais que prepara com tanta dedicação e capricho.

Aos colegas que estão ou que passaram pelo laboratório de epigenética durante os dois anos do mestrado, principalmente à Ednéia Cavallieri e Renata Slowik, que me ensinaram com muita dedicação a maioria das técnicas realizadas no laboratório.

Aos colegas do mestrado, pelo convívio e amizade principalmente na época de realização das disciplinas do programa. São pessoas muito queridas que levarei para sempre comigo.

Às minhas amigas e colegas, Edneia, Janaína e Vanessa, pelos momentos maravilhosos que passamos, pelas conversas, pelo carinho e pelo incentivo. Muito obrigada por terem me dado forças para continuar quando eu não acreditava que conseguiria. Obrigada pelos conselhos, pelas palavras amigas e por partilharem comigo um pouquinho da vida de vocês.

Aos meus pais, Salete Patel e Idelfonso Pereira da Silva, por terem me dado a vida e ensinado a valorizá-la sempre, por me amarem incondicionalmente, por sempre estarem do meu lado, por me apoiarem em todas as decisões que já tomei na vida, por terem me ensinado a ser quem sou hoje, por confiarem em mim,

Ao meu irmão, Felipe Afonso da Silva, pelo convívio, amizade, conselhos e confidências.

Aos meus padrinhos e nonos, Dosolina Mangini Patel e Daniel Patel (*in memoriam*), por terem me ensinado muitos dos valores que tenho hoje comigo, por me darem exemplos de vida a serem seguidos e, simplesmente, por serem tão especiais para mim.

Aos meus familiares, por me lembrarem, até mesmo nas fases difíceis, do meu valor, por estarem comigo para comemorar minhas vitórias e sempre me oferecerem uma palavra de incentivo nos meus fracassos.

*“Na serenidade e na confiança
Residirá a tua força.”*

(Isaías, 30:15)

RESUMO

A proteína MMP-2 é membro da família das metaloproteases de matriz, que atuam na clivagem proteolítica de diversos constituintes da matriz extracelular. Por clivar o principal constituinte das membranas basais, o colágeno tipo IV, a MMP-2 possui importante papel nos processos de invasão e metástases tumorais. Um estudo desenvolvido com a linhagem tumoral de mama MCF7 mostrou que o gene *MMP2* apresenta hipermetilação da ilha de CpG na região promotora sugerindo que a expressão dessa enzima no câncer de mama poderia ser regulada por mecanismos epigenéticos (Chernov *et al.*, 2009). Neste trabalho, damos continuidade ao estudo da regulação epigenética da *MMP2* em tumores primários de mama, com intuito de verificar sua aplicação como marcador molecular no prognóstico da doença. Após o tratamento do DNA de 25 amostras tumorais de mama com bissulfato de sódio, foi realizada a metodologia do PCR específico para metilação (MSP) com iniciadores utilizados por Chernov (2009). Foi verificada diferença na metilação entre os tumores de mama, sendo 48% das amostras consideradas metiladas para *MMP2*. Para análise de imunohistoquímica (IHQ) da MMP-2 em 18 dos tumores, 78% destes apresentavam expressão de MMP-2. Quando comparamos a presença de MMP-2 (IHQ) com a metilação do gene (MSP) tivemos um resultado contraditório e não significativo, indicando que outros iniciadores devem ser planejados para o estudo de metilação do gene *MMP2* em tumores de mama. Analisando os dados de IHQ com as variáveis clínico-patológicas, observamos que 85% das amostras contendo menos de 30% das células coradas para receptor de estrogênio (RE) apresentaram expressão de MMP-2, enquanto que as amostras com mais de 30% das células coradas para RE, esse valor diminuiu para 50%. Todas as amostras que apresentavam o gene do receptor de estrogênio metilado (*ESR1*) apresentam expressão de MMP-2 e das amostras *ESR1* não metiladas, apenas 43% apresentam expressão de MMP-2. Portanto em nosso trabalho observamos que é muito importante avaliar a presença da proteína MMP-2 em câncer de mama porque esse dado em conjunto com a negatividade de RE indica um mau prognóstico.

Palavras-chave: MMP-2. Câncer de mama. Epigenética.

ABSTRACT

MMP-2 is a member of the family of matrix metalloproteinases, which the main role is the proteolytic cleavage of several members of the extracellular matrix. MMP-2 is able to cleave type IV collagen, the major constituent of basal membranes, which is an important role in tumor invasion and metastasis. Previous studies have shown that a breast cancer cell line is hypermethylated in the MMP-2 CpG island, suggesting that epigenetic mechanisms regulate the expression of this enzyme in breast cancer (Chernov *et al.*, 2009). In this work, we continued the study of epigenetic regulation of *MMP2* in primary breast tumors, in order to verify if it can be used as a molecular marker of disease prognosis. After sodium bisulfite treatment of the DNA from 25 breast tumor samples, we used the methylation specific PCR (MSP) assays with the primers described by Chernov (2009). There were differences in methylation status between the primary breast tumor samples, 48% of samples were considered methylated to *MMP2* gene. Immunohistochemistry assays (IHC) of MMP-2 was performed in 18 tumors, 78% of these showed expression of MMP-2 protein. We had a contradictory and not significant result when we compared the presence of the enzyme (IHC) and gene methylation (MSP). Analyzing IHC results with the clinical pathological data, we found that 85% of the samples containing less than 30% of cells stained for estrogen receptor (ER) showed MMP-2 expression, while samples with more than 30% of cells staining for ER, this value decreases to 50%. All samples that were methylated to the estrogen receptor gene (*ESR1*) showed expression MMP-2 and to *ESR1* unmethylated samples only 43% showed MMP-2 expression. Therefore, in our study we found that it is very important to analyze the presence of MMP-2 protein in breast cancer once this information analyzed along with the negativity of ER indicates a poor prognosis.

Key words: MMP-2. Breast cancer. Epigenetic.

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. O Câncer	1
1.1.1. Mecanismos Moleculares do Câncer	1
1.1.2. O Microambiente Tumoral	3
1.2. Câncer de Mama	4
1.2.1. A Mama Normal e o Câncer de Mama	4
1.2.2. Tipos de Câncer de Mama	6
1.2.3. Fatores de Risco	8
1.2.4. Sintomas, Diagnóstico e Prognóstico do Câncer de Mama	8
1.2.5. Estadiamento do Câncer e Sistema TNM	9
1.2.6. Marcadores Moleculares no Câncer de Mama	10
1.3. EPIGENÉTICA	13
1.3.1. RNAs não codificantes – ncRNAs	13
1.3.2. Modificações Covalentes das Histonas	14
1.3.3. Modificação do DNA: Metilação	16
1.3.4. Metilação do DNA e Câncer	19
1.4. METALOPROTEASES DE MATRIZ – MMPs	21
1.4.1. Estrutura e Função	21
1.4.2. Regulação	24
1.4.3. MMPs e Câncer	26
1.4.4. Gelatinase A, Metaloprotease-2 ou MMP-2	31
2. OBJETIVO GERAL	35
2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	35
3. MATERIAIS E MÉTODOS	36
3.1. MATERIAL BIOLÓGICO	36
3.2. CULTIVO DE CÉLULAS	37
3.3. AVALIAÇÃO DO PADRÃO DE TRANSCRIÇÃO DO GENE <i>MMP2</i> POR RT-PCR NAS LINHAGENS DE MAMA	38
3.3.1. Extração de RNA	38
3.3.2. Obtenção da Primeira Fita de cDNA	39
3.3.3. RT-PCR do Gene <i>MMP2</i> nas Linhagens de Mama	39
3.3.4. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida 8%	40
3.4. ANÁLISE DO PERFIL DE METILAÇÃO DO GENE <i>MMP2</i>	40
3.4.1. Extração de DNA	40
3.4.2. Tratamento de DNA com Bissulfito de Sódio	41
3.4.3. PCR específico para Metilação (MSP) do gene <i>MMP2</i>	41
3.5. ANÁLISE DA EXPRESSÃO PROTÉICA DA MMP-2	42
3.5.1. <i>Tissue Micro-Array</i> – TMA	42
3.5.2. Imunohistoquímica – IHQ	43
3.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS	44
4. RESULTADOS	45
4.1. ANÁLISE <i>IN SÍLICO</i> DO GENE <i>MMP2</i>	45
4.2. ANÁLISE DA EXPRESSÃO DO GENE <i>MMP2</i> POR RT-PCR EM LINHAGENS DE MAMA	47
4.3. ANÁLISE DA METILAÇÃO EM AMOSTRAS DE TUMORES PRIMÁRIOS DE MAMA	48

4.4. IMUNOHISTOQUÍMICA (IHQ) DA MMP-2	50
4.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS DE METILAÇÃO DA ILHA DE CpG DO GENE <i>MMP2</i> EM RELAÇÃO AOS DADOS DE EXPRESSÃO PROTÉICA E CLÍNICO-PATOLÓGICOS	53
5. DISCUSSÃO	60
6. CONCLUSÃO	67
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68

LISTA DE FIGURAS

	Página
FIGURA 1: ESTRUTURA DA GLÂNDULA MAMÁRIA E O TECIDO MAMÁRIO NORMAL	5
FIGURA 2: PROGRESSÃO DO CARCINOMA DUCTAL	7
FIGURA 3: MODIFICAÇÕES COVALENTES NA HISTONA H3	15
FIGURA 4: METILAÇÃO DA CITOSINA	16
FIGURA 5: ESTRUTURA DA CROMATINA EM PROMOTORES ATIVOS E INATIVOS	18
FIGURA 6: PADRÕES DE METILAÇÃO DO DNA DURANTE A CARCINOGENESE	19
FIGURA 7: ESTRUTURA DE DOMÍNIOS DAS MMPs	22
FIGURA 8: EXPRESSÃO DE MMPs EM TUMORES DE MAMA	27
FIGURA 9: ELEMENTOS REGULATÓRIOS NA REGIÃO PROMOTORA DO GENE <i>MMP2</i> HUMANO	31
FIGURA 10: DIAGRAMA EM TRÊS DIMENSÕES DO COMPLEXO proMMP-2/TIMP-2	32
FIGURA 11: ILHAS DE CpG DO GENE <i>MMP2</i>	45
FIGURA 12: ILHA DE CPG DO GENE <i>MMP2</i>	46
FIGURA 13: RNA TOTAL EXTRAÍDO DE LINHAGENS DE MAMA	47
FIGURA 14: RT-PCR DO GENE DE EXPRESSÃO CONSTITUTIVA <i>GAPDH</i> E DO GENE <i>MMP2</i> EM LINHAGENS DE MAMA	48
FIGURA 15: DNAs EXTRAÍDOS DE TUMORES PRIMÁRIOS DE MAMA.	48
FIGURA 16: CONTROLE DA EFICIÊNCIA DO TRATAMENTO DE DNA COM BISSULFITO DE SÓDIO	49
FIGURA 17: MSP DO GENE <i>MMP2</i> EM LINHAGENS CELULARES DE MAMA	49
FIGURA 18: MSP DO GENE <i>MMP2</i> EM AMOSTRAS DE TUMORES PRIMÁRIOS DE MAMA	50
FIGURA 19: CONTROLES DE REATIVIDADE DO ANTICORPO	51
FIGURA 20: IMUNOHISTOQUÍMICA DE TUMORES PRIMÁRIOS DE MAMA	52
FIGURA 21: ANÁLISE ESTATÍSTICA ENTRE MMP-2 (IHQ) E RECEPTOR DE ESTRÓGENO ALFA	58
FIGURA 22: ANÁLISE ESTATÍSTICA ENTRE MMP-2 (IHQ) E METILAÇÃO DO GENE <i>ESR1</i>	58

LISTA DE TABELAS

	Página
TABELA 1: CLASSIFICAÇÃO DOS TUMORES EM ESTADIOS	10
TABELA 2: MMPs CANDIDATAS A BIOMARCADORES NO CÂNCER	29
TABELA 3 : INICIADORES PARA MSP	42
TABELA 4: REAÇÕES DE MSP, IHQ E DADOS CLÍNICO PATOLÓGICOS DAS AMOSTRAS TUMORAIS DE MAMA	54
TABELA 5: ANÁLISE DA ASSOCIAÇÃO ENTRE A METILAÇÃO DO GENE <i>MMP2</i> COM DADOS CLÍNICO-PATOLÓGICOS DOS TUMORES DE MAMA	55
TABELA 6: ANÁLISE DA ASSOCIAÇÃO ENTRE A IMUNOHISTOQUÍMICA DA MMP-2 COM DADOS DE METILAÇÃO E CLÍNICO-PATOLÓGICOS DOS TUMORES DE MAMA	56
TABELA 7: ANÁLISE DA ASSOCIAÇÃO ENTRE A METILAÇÃO E A IMUNOHISTOQUÍMICA DA MMP-2 COM DIFERENTE AGRUPAMENTO DE EXPRESSÃO	57
TABELA 8: TABELA SOBREVIDA GLOBAL E LIVRE DE DOENÇA – COX	59

ABREVIATURAS

AJCC: American Joint Committee on Cancer
BRCA1: do inglês, breast câncer gene 1
BRCA2: do inglês, breast câncer gene 2
CIS: carcinoma *in situ*
CONEP: Conselho Nacional de Ética em Pesquisa
DEPC: dietilpirocarbonato
DNMTs: enzimas DNA metil-transferases
DO: densidade óptica
EMMPRIN: do inglês, extracellular matrix metalloproteinase inducer
ERBB2: gene da proteína HER2
ESR1: gene do receptor de estrógeno alfa
GAPDH: gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
HATs: enzimas acetil transferases
HDACs: enzimas desacetilases
HER2: do inglês, human epidermal growth factor receptor type 2
HMTs: enzimas histonas demetilases
INCA: Instituto Nacional do Câncer
IHC: imunohistoquímica
Lys: aminoácido lisina
MDBs: do inglês, methyl-CpG binding proteins
MEC: matriz extracelular
MMP: metaloprotease de matriz
MMP: gene metaloprotease de matriz
MSP: do inglês, methylation specific PCR
RE: receptor de estrógeno
RISC: do inglês, RNA-induced silencing complex
RM: ressonância magnética
RP: receptor de progesterona
SBR: Scarff-Bloom-Richardson
Ser: aminoácido serina
SFB: soro fetal bovino
TDLU: terminais ducto:lobulares
TEB: do inglês, terminal end buds
TEM: transição epitelial-mesenquimal
TGF- β : do inglês, transforming growth factor- β
TIMP: do inglês, tissue inhibitor of metalloproteinases
TNF- α : fator de necrose tumoral- α
TSS: do inglês, transcription start site
VEGF: fator de crescimento endotelial vascular

1. INTRODUÇÃO

1.1. O CÂNCER

O câncer é a segunda causa de mortes na população mundial e brasileira, sendo as doenças cardiovasculares a primeira. Em 2008, foram estimados 12,4 milhões de novos casos e 7,6 milhões de óbitos por câncer no mundo. No Brasil, as estimativas para o ano de 2010 e também 2011 apontam para a ocorrência de 489.270 novos casos de câncer (INCA, 2009). A neoplasia com maior incidência na população brasileira deverá ser o câncer de pele não melanoma, com 113.850 casos novos. Em seguida, aparece o câncer de próstata, com 52.350 novos casos; o câncer de mama, com 49.240 novos casos e o câncer de pulmão, com 27.630 novos casos. O câncer de mama permanece como o segundo tipo de câncer mais freqüente no mundo e o primeiro entre as mulheres. A cada ano, aproximadamente 22% dos casos novos de câncer em mulheres são de mama (INCA, 2009).

1.1.1. Mecanismos moleculares do câncer

A progressão do câncer é um processo complexo que pode ser dividido em algumas etapas. A maioria delas envolve modificações em genes que estão de alguma forma, envolvidos com o controle do ciclo celular (Park e Lee, 2003). Entre eles, estão os proto-oncogenes, que atuam no estímulo do ciclo celular normal e, que na sua forma mutada ou amplificada são denominados de oncogenes e são observados em células tumorais. Em contraste, os genes supressores de tumor atuam regulando negativamente o ciclo celular normal e estão geralmente silenciados por diversos mecanismos no câncer (Barrett, Oshimura *et al.*, 1986).

Em 2000 Hanahan e Weinberg sugeriram a existência de seis alterações fundamentais na fisiologia da célula para que ela adquira um fenótipo maligno. São elas: auto-suficiência de sinais de crescimento; insensibilidade aos sinais inibitórios de crescimento; evasão da morte celular programada (apoptose); potencial replicativo ilimitado; angiogênese sustentada; e a invasão tecidual e metástase. Cada passo é crítico para o desenvolvimento de células hiperplásicas até um tumor avançado que tem a capacidade de formar metástases para locais distantes (Hanahan e Weinberg, 2000).

Uma das características das células tumorais é que elas não precisam de estímulos externos para proliferar. Podem utilizar pelo menos três estratégias moleculares para adquirir autonomia proliferativa, envolvendo alterações nos sinais extracelulares de crescimento, nos transdutores de sinais intracelulares e nos circuitos intracelulares que traduzem os sinais em ação. Por outro lado se existirem sinais anti-proliferativos, as células tumorais podem também entrar na fase G1 do ciclo celular utilizando mecanismos semelhantes (Hanahan e Weinberg, 2000).

Em algum momento de sua progressão a célula tumoral ganha resistência à morte celular programada ou apoptose. Um dos mecanismos mais conhecidos é a perda da proteína p53 funcional, que é observado em 50% dos tumores humanos (Harris, 1996). A proteína p53 tem sua expressão aumentada quando ocorrem lesões no DNA. Suas principais funções são a ativação de genes de reparo do DNA, parada do ciclo celular e apoptose caso os danos não possam ser reparados. Hanahan e Weinberg sugerem também que as populações de células pré-malignas somente conseguem completar seu potencial tumorigênico se, além de quebrar a barreira da mortalidade, adquirirem potencial replicativo ilimitado através da manutenção de seus telômeros, ao longo das divisões celulares. Os telômeros estão localizados nas extremidades dos cromossomos e parte deles é perdida a cada processo de replicação, até chegar a um limite onde a célula não replica mais e acaba entrando em apoptose. Para evitar que isso aconteça, as células tumorais mantêm os seus telômeros (Shay e Bacchetti, 1997), através da re-expressão da enzima telomerase, que é encontrada normalmente apenas em células-tronco embrionárias. A super expressão da telomerase é observada em 85 a 90% dos tumores humanos (Bryan e Cech, 1999).

As células tumorais precisam ativar genes específicos para promover angiogênese para que possam sobreviver na massa tumoral (Hanahan e Weinberg, 2000). Geralmente, elas apresentam um desequilíbrio local entre os sinais angiogênicos, com aumento da expressão de fatores pró-angiogênicos e a diminuição da expressão dos fatores anti-angiogênicos (Plate, Breier *et al.*, 1994).

Em algum momento durante o desenvolvimento da maioria dos tipos de câncer humanos, a massa do tumor primário pode gerar algumas células que

passam a invadir tecidos adjacentes e depois adquirem a capacidade de migração para locais distantes, aonde podem se estabelecer para formar novas colônias, que são denominadas metástases (Hanahan e Weinberg, 2000). Do ponto de vista clínico, as metástases são consideradas um dos mais importantes estágios da tumorigênese, visto que são a causa de mais de 90% das mortes por câncer (Sporn, 1996). No processo metastático atuam as células tumorais, inflamatórias e estromais. Inicialmente ocorre a transição epitelial-mesenquimal (TEM), na qual é notada a perda de expressão da molécula de adesão E-caderina e as células tumorais passam a mostrar características fibroblásticas, aumentando sua motilidade (Kalluri e Weinberg, 2009). A saída das células tumorais do sítio inicial em direção aos vasos sanguíneos ou linfáticos é conhecida por intravasamento, e compreende o segundo passo do processo metastático. Estima-se que apenas 0,01% das células conseguem passar pela 3ª fase, representada pela sobrevivência das células metastáticas durante percurso realizado na corrente circulatória (Joyce e Pollard, 2009). Na seqüência, ocorre o extravasamento, etapa em que as células tumorais sobreviventes atravessam a corrente sanguínea, com intermédio de moléculas de adesão, principalmente integrinas, em direção ao novo tecido alvo. Por fim, as células tumorais chegam ao seu destino, interagindo com as células do estroma e inflamatórias do novo local secundário para que possam se estabelecer e iniciar a proliferação (Polyak e Weinberg, 2009).

Para efetivamente ocorrer o processo metastático, além do aumento da motilidade das células tumorais, é necessária a destruição da matriz extracelular (MEC) próxima a essas células, abrindo um caminho para sua passagem. Alguns modelos celulares e animais mostram que nesta etapa ocorre a produção de metaloproteases de matriz (MMPs), especialmente as gelatinases (MMP-2 e MMP-9), pelas células tumorais e/ou estromais (Stamenkovic, 2000).

1.1.2. O microambiente tumoral

O tumor não é meramente uma massa contendo um único genótipo clonal, mas sim uma comunidade de células tumorais heterogêneas e de células estromais localizadas na matriz extracelular, nutridas por um sistema

vascular (Aznavorian, Stracke *et al.*, 1990). A heterogeneidade e complexidade do microambiente tumoral têm grande importância no desenvolvimento, crescimento, formação de metástases e até mesmo na resistência a terapia de muitos tipos de câncer (Ohtani, 1998).

O estroma nos tumores é composto por membrana basal, leucócitos, capilares neoformados, fibroblastos e pela matriz extracelular (MEC) localizada em torno das células tumorais. Durante a progressão do câncer, a matriz estará sofrendo constante remodelamento, tanto pela degradação de moléculas pré-existentes, quanto pela síntese de novos componentes (Kaspar, Zardi *et al.*, 2006). O crescimento tumoral é, portanto, influenciado também pelo estroma, principalmente pelos fibroblastos, e não apenas pelas células malignas propriamente ditas (Kalluri, 2003).

Entre as funções dos fibroblastos, destacam-se a deposição de proteínas da MEC, a regulação da diferenciação epitelial, a regulação de inflamação e também o envolvimento na cicatrização tecidual (Tomasek, Gabbiani *et al.*, 2002). Também são fontes de proteases que degradam a MEC, as MMPs, que têm considerável importância na manutenção da homeostase da matriz. Dentro do estroma tumoral, a maioria dos fibroblastos adquire um fenótipo modificado, interagindo com as células neoplásicas, epiteliais, endoteliais e inflamatórias através da liberação de fatores de crescimento, colágeno tipo I e III, MMPs, entre outros (Kalluri e Zeisberg, 2006). No câncer de mama, por exemplo, aproximadamente 80% dos fibroblastos estromais adquirem este tipo de fenótipo (Sappino, Skalli *et al.*, 1988).

1.2. CÂNCER DE MAMA

1.2.1. A mama normal e o câncer de mama

A glândula mamária é composta por um estroma fibrogorduroso e por ductos ocos que formam uma estrutura “arbórea” que se inicia nos mamilos (encontro de todos os ramos ductais) e termina nos lóbulos (Kopans, 2007) (Figura 1). Nessas estruturas ductais existe uma camada epitelial interna e, ao seu redor, uma camada mioepitelial, capaz de contração em resposta à ocitocina durante a lactação, e de secretar a lâmina basal que separa o parênquima mamário do estroma (Paguirigan, Beebe *et al.*, 2006). As células epiteliais e mioepiteliais são também designadas de células ductais. Grande

parte dos tumores de mama (65%) são carcinomas que envolvem exclusivamente a linhagem epitelial. Externamente às células mioepiteliais existe uma camada de revestimento, a membrana basal, que separa os ductos do estroma mamário.

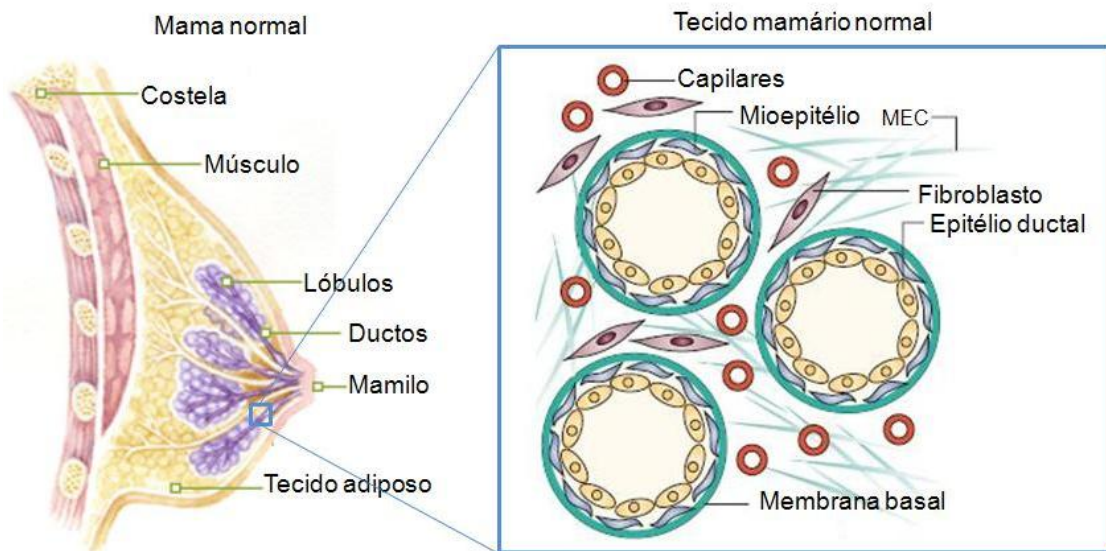


FIGURA 1: ESTRUTURA DA GLÂNDULA MAMÁRIA E O TECIDO MAMÁRIO NORMAL. À esquerda temos a visualização das estruturas que compõe a glândula mamária adulta normal. À direita há uma ampliação do tecido ductal e seus componentes.

Fonte: Adaptado de Portal de Oncologia <http://www.pop.eu.com> e Kalluri e Zeisberg, 2006.

As células lobulares originam estruturas acinares secretórias ao final dos ductos e, durante a gravidez e a lactação, tais células são capazes de produzir as proteínas do leite (Woodward, 2005). Esta região final dos ductos associada a estruturas acinares é designada de unidade terminal ducto-lobular (TDLU). As TDLUs são consideradas as unidades funcionais da mama (Warri, 2007).

Os TEBs (*terminal end buds*) são as estruturas precursoras dos TDLUs, e assim como as TDLU, principais áreas do epitélio mamário responsivas aos hormônios. Além disso, supõe-se que nestas estruturas existam células-tronco que podem estar sujeitas a sofrer lesões pré-malignas e desencadear o câncer (Warri, 2007).

A iniciação do câncer de mama se deve a eventos genéticos e epigenéticos de transformação em uma única célula. E, de acordo com o modelo da expansão clonal, a progressão da neoplasia continua até a formação de uma massa tumoral com assinatura de expressão gênica específica. A maior parte dos estudos realizados para este tipo de neoplasia

envolve células epiteliais, as principais responsáveis pelo surgimento do câncer de mama. A possibilidade da existência de tumores originados das células mioepiteliais e estromais ainda não foi totalmente explorada (Polyak, 2007). Entretanto, sua participação em eventos modulatórios no crescimento, sobrevivência, polaridade e comportamento invasivo das células neoplásicas da mama é bem estabelecida (Elenbaas e Weinberg, 2001; Kalluri e Zeisberg, 2006).

Apesar de ser considerado um câncer de prognóstico relativamente bom, se diagnosticado e tratado oportunamente, as taxas de mortalidade para o câncer de mama continuam elevadas no Brasil, muito provavelmente porque a doença ainda seja diagnosticada freqüentemente em estádios avançados (INCA, 2009).

1.2.2. Tipos de câncer de mama

Os carcinomas de mama são os mais comuns e são aqueles que têm origem no tecido epitelial. Classificam-se quanto à extensão, em carcinoma *in situ* ou invasor e, quanto à localização em ductal ou lobular (Kopans, 2007).

O carcinoma *in situ* (CIS) é composto por uma lesão neoplásica, onde estão presentes as células tumorais. A lesão está limitada ao microambiente tecidual, permanecendo separada do tecido normal à sua volta pela membrana basal (Kalluri e Zeisberg, 2006). O CIS é associado com um estroma semelhante ao observado durante o processo de cicatrização, que é chamado de “estroma reativo” (Ronnov-Jessen, Petersen *et al.*, 1996).

Para que um CIS se torne invasivo, é necessário que ocorra a destruição da membrana basal que separa as células neoplásicas do restante do tecido (Figura 2) (Hanahan e Weinberg, 2000). Na etapa da progressão do CIS para o carcinoma invasivo, as células tumorais invadem o estroma reativo, entrando em contato com todos os seus componentes (Ronnov-Jessen, Petersen *et al.*, 1996).

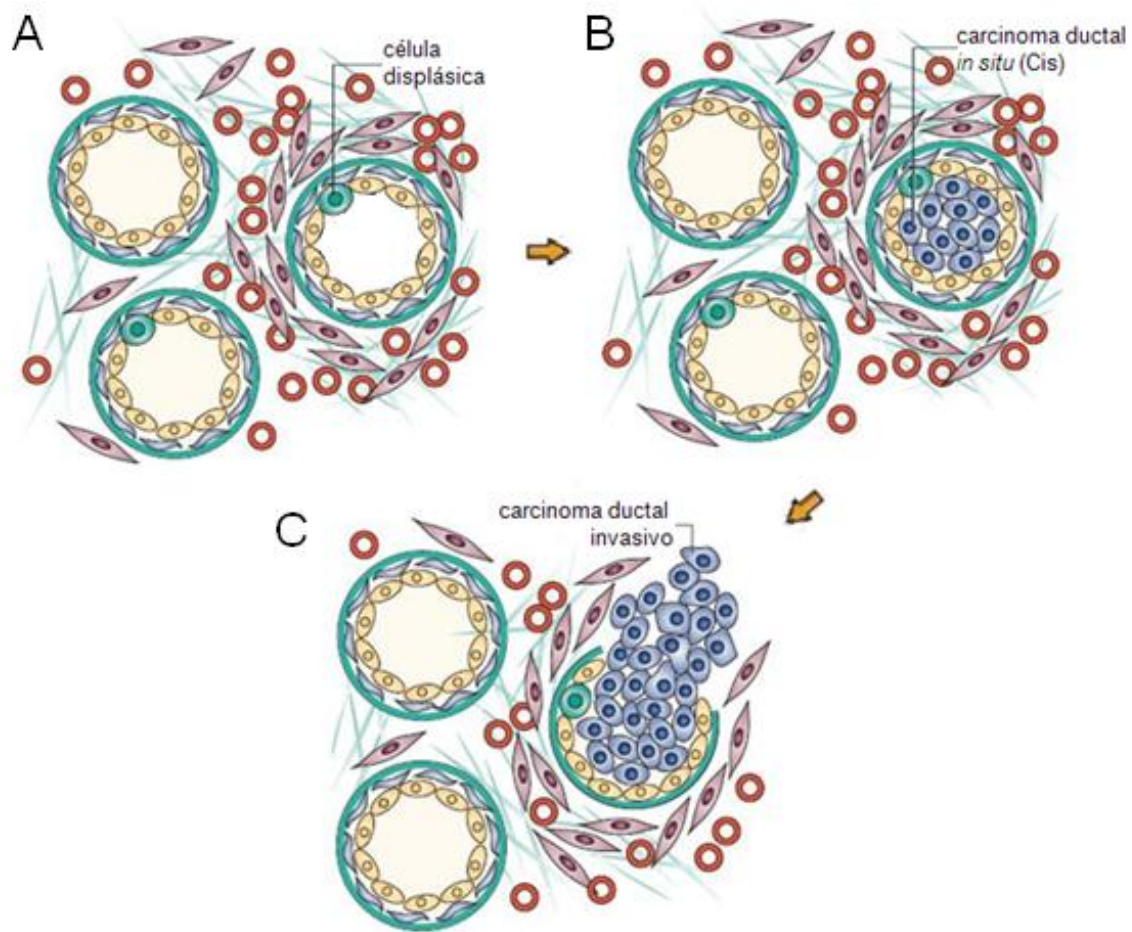


FIGURA 2: PROGRESSÃO DO CARCINOMA DUCTAL. A) Tecido mamário apresentando uma célula epitelial ductal pré-maligna (displásica). B) Expansão da massa tumoral formando um carcinoma ductal *in situ*. C) Rompimento da membrana basal do ducto e invasão do estroma mamário, caracterizando o carcinoma ductal invasivo.

Fonte: Adaptado de Kalluri e Zeisberg, 2006.

O carcinoma ductal *in situ* representa a forma inicial, não invasiva e com bom prognóstico. (Virnig, Shamliyan *et al.*, 2009; Virnig, Tuttle *et al.*, 2010). O carcinoma ductal invasivo corresponde a até 80% dos carcinomas de mama e possui sobrevida estimada de apenas 35 a 50% após 10 anos do diagnóstico da doença (Weigelt, Peterse *et al.*, 2005).

O carcinoma lobular se origina em lóbulos e corresponde de dez a 30% dos carcinomas de mama. O carcinoma lobular invasivo possui bom prognóstico e sobrevida de dez anos em 80 a 90% dos casos (Tavassoli, 2010).

1.2.3. Fatores de risco

Os principais fatores de risco para o câncer de mama estão relacionados à vida reprodutiva da mulher, sendo eles: menarca precoce, nuliparidade, idade da primeira gestação acima dos 30 anos, uso de anticoncepcionais orais, menopausa tardia e terapia de reposição hormonal (Bilimoria e Morrow, 1995). A idade continua sendo um dos mais importantes fatores de risco. As taxas de incidência aumentam rapidamente até os 50 anos, na faixa de idade em que a menopausa geralmente ocorre, e posteriormente, esse aumento ocorre de forma mais lenta (Bilimoria e Morrow, 1995). O consumo de álcool é outro fator responsável por elevar o risco do câncer de mama. O acetaldeído, resultante do metabolismo do álcool, é um carcinógeno que pode promover o desenvolvimento do tumor (Bilimoria e Morrow, 1995).

Fatores genéticos também estão associados ao maior risco de desenvolvimento de câncer de mama. Mulheres que apresentam mutação nos genes BRCA1 e BRCA2, por exemplo, têm 85% de chance de desenvolver câncer de mama antes dos 70 anos de idade. A amamentação, prática de atividade física e alimentação saudável com a manutenção do peso corporal estão associadas a um menor risco de desenvolver esse tipo de câncer (Bilimoria e Morrow, 1995).

1.2.4. Sintomas, diagnóstico e prognóstico do câncer de mama

Alguns dos sintomas verificados no câncer de mama incluem: nódulo palpável na mama e/ou nas axilas; secreção mamilar; deformidades no formato da mama por retrações da pele; alterações da coloração, superfície ou textura da pele da mama ou do mamilo; e mudança do tamanho ou do formato da mama (Kopans, 2007).

Os métodos de detecção comumente usados para diagnosticar o câncer de mama incluem o auto-exame das mamas, a mamografia e o ultra-som. A mamografia de alta resolução é apontada como o principal método diagnóstico do câncer de mama em estágio inicial, capaz de detectar alterações ainda não palpáveis, favorecendo, assim, o tratamento precoce, mais efetivo, menos agressivo, com melhores resultados estéticos e eventos adversos reduzidos (INCA, 2009; Holloway, Easson *et al.*, 2010). No Brasil é recomendado realizar mamografia anual para mulheres acima de 50 anos e, para aquelas que

apresentam risco elevado de desenvolvimento de câncer de mama, a partir dos 35 anos (INCA, 2009). O ultra-som apresenta baixa especificidade e altos índices de falsos positivos e de falsos negativos. É um exame que complementa a mamografia, auxiliando na caracterização dos tumores sólidos e císticos, sendo também empregada para guiar punções citológicas ou histológicas (Holloway, Easson *et al.*, 2010). Entretanto, é ainda a prática de auto-exame que detecta primariamente cerca de 90% das patologias mamárias (INCA, 2009).

Além de identificar a doença, é necessário obter informações sobre fatores específicos que determinam o comportamento do câncer. Esses fatores podem ser prognósticos, quando se correlacionam com a sobrevida total ou com o tempo livre de doença; ou preditivos, quando relacionados com a resposta terapêutica (Cianfrocca e Goldstein, 2004) e são principalmente: acometimento dos linfonodos axilares, tamanho do tumor, tipo histológico, grau histológico, grau nuclear, níveis de progesterona e estrógeno, velocidade de proliferação tumoral e competência imunológica do portador da doença (Fitzgibbons, Page *et al.*, 2000).

1.2.5. Estadiamento do câncer e sistema TNM

O estadiamento do câncer é uma ferramenta que auxilia na definição do tratamento, fornece indicações de prognóstico e de possibilidade de recuperação da paciente. O sistema TNM, criado pelo AJCC (*The American Joint Committee on Cancer*), é o mais utilizado e está baseado na avaliação do tamanho do tumor (T), no envolvimento de linfonodos (N) e na presença de metástases distantes (M) (Tabela 1) (Barros, Barbosa *et al.*, 2001).

O TNM ressalta a importância do tamanho do tumor e do acometimento de linfonodos, que são os principais fatores prognósticos do câncer de mama. Cerca de 70% das pacientes linfonodo-positivas irão apresentar recidiva em até 10 anos, enquanto que para as pacientes linfonodo-negativas, essa porcentagem diminui para 20 a 30% (Fitzgibbons, Page *et al.*, 2000). Entretanto, apesar de possuir um melhor prognóstico, 30% das linfonodo-negativas, vem a óbito por causa da doença, ressaltando a necessidade da identificação de fatores prognósticos adicionais (Radice e Redaelli, 2003). A presença de metástases a distância classifica o tumor em um estadio isolado,

independendo dos valores de T ou N. Isto pode ser explicado pela gravidade da presença de tumores secundários em sítios distantes, classificando o câncer de mama como incurável (Cianfrocca e Goldstein, 2004).

TABELA 1: CLASSIFICAÇÃO DOS TUMORES EM ESTÁDIOS.

	T	N	M
Estadio 0	Tis	N0	M0
Estadio I	T1	N0	M0
Estadio II A	T0	N1	M0
	T1	N1	M0
	T2	N0	M0
Estadio II B	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
Estadio III A	T0	N2	M0
	T1	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N1/N2	M0
Estadio III B	T4	N0/N1/N2	M0
Estadio III C	Qualquer T	N3	M0
Estadio IV	Qualquer T	Qualquer N	M1

Fonte: (Barros, Barbosa *et al.*, 2001).

1.2.6. Marcadores moleculares no câncer de mama

O câncer de mama não é uma doença homogênea, apresenta diversas variáveis que atuam no seu desenvolvimento e também em como cada paciente específico irá, por exemplo, reagir a certo tipo de tratamento (Polyak, 2007). Alguns exemplos de genes envolvidos no processo da tumorigênese da mama e que são usados como marcadores moleculares são o oncogene *ERBB2*, os receptores de hormônios esteróides (receptor de estrógeno e receptor de progesterona), o gene supressor de tumor *TP53*, o receptor do ácido retinóico β , o gene *PDGF* (*platelleted derived growth factor*), o gene *VEGF* (*vascular endothelial growth factor*) (Keen e Davidson, 2003). No Brasil, segundo a Associação Médica Brasileira e o Conselho Federal de Medicina, é recomendado realizar a análise imunohistoquímica dos receptores de estrógeno e progesterona em todos os casos de câncer de mama e, naquelas

pacientes que apresentam metástases axilares ou à distância, realiza-se a análise do produto do oncogene ERBB2 (Barros, Barbosa *et al.*, 2001).

O gene *ERBB2* produz a proteína denominada HER2, neu ou c-erb é super-expresso em aproximadamente 20% a 25% dos carcinomas ductais de mama (Couturier, Vincent-Salomon *et al.*, 2008). Esse oncogene codifica uma glicoproteína transmembrana contendo 185 kDa, denominada de p185^{erb}, que é semelhante ao receptor do fator de crescimento epidérmico e possui atividade tirosina-quinase. Em geral, mulheres com carcinoma invasivo HER2 positivo possuem uma doença mais agressiva, com pior prognóstico maior probabilidade de recidiva, e sobrevida global menor, quando comparadas com as mulheres HER2 negativas (Henry e Hayes, 2006).

Em 1992 foi desenvolvido o anticorpo monoclonal Herceptin® (trastuzumab) que se liga ao HER2, impedindo a sinalização de crescimento. O tratamento apenas com Herceptin® produziu resposta antitumoral em 15-20% das pacientes com metástase de carcinoma de mama e, em associação a outros quimioterápicos (doxorrubicina, ciclofosfamida ou paclitaxel), aumentou a eficácia da quimioterapia, resultando em uma sobrevida maior do paciente (Carter, Presta *et al.*, 1992).

O estrógeno é um hormônio esteroidal que atua como estímulo proliferativo em células normais dos órgãos proliferativos, sendo considerado um estimulante para a iniciação e promoção de tumores nestes órgãos. O crescimento estimulado pelos estrógenos em células normais ou tumorais requer a presença de receptores de estrógeno (RE). Aproximadamente 70% dos tumores de mama expressam altas concentrações de REs quando comparadas com tecido normal (*Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group*, 1998). O grau de expressão de RE é relacionado a uma variedade de características histológicas no câncer de mama. Os tumores que apresentam pouca ou nenhuma diferenciação celular são geralmente RE negativo e, portanto, de pior prognóstico (Millis, 1980).

Os casos que apresentam RE positivo (70% dos casos de câncer de mama) (Fabian, 2007) contam com diversas possibilidades de terapia, denominada de terapia hormonal. Como exemplos, há moduladores seletivos de RE, como tamoxifen, que interferem na ligação do estrógeno ao seu receptor. Também há o fulvestrant, que atua diminuindo a expressão do gene

do receptor de estrógeno denominado *ESR1*. Das duas maneiras há o bloqueio da sinalização proliferativa causada pelo estrógeno. A maioria dos tumores RE positivo são inicialmente responsivos ao tamoxifen. Os inibidores de aromatase tais como o anastrozol e letrozol são especialmente usados em pacientes que se tornam resistentes ao tamoxifen. Existem ainda pacientes que se tornam resistentes a essas duas abordagens de tratamento (Ikeda e Inoue, 2004). Os mecanismos que envolvem a resistência hormonal no câncer de mama são complexos e ainda pouco compreendidos.

O gene receptor de progesterona (RP), importante para o desenvolvimento da glândula mamária e do aparelho reprodutor feminino, possui duas isoformas, RPA e RPB. Estudos têm revelado, que em casos de tumores com prognóstico ruim a razão entre RPA e RPB é alterada com predominância de RPA e perda de RPB nesses tumores (Hopp, Weiss *et al.*, 2004). O receptor de progesterona promove a proliferação celular e pode ser expresso tanto em tecidos normais quanto em neoplásicos (Liu, Zhang *et al.*, 2004). A perda de expressão de RP e RE constitui um potencial mecanismo de resistência à terapia hormonal e, em ambos os casos, a inativação da expressão desses genes por mecanismos epigenéticos tem um importante papel neste contexto (Liu, Zhang *et al.*, 2004).

A identificação do perfil de expressão gênica dos carcinomas de mama, por meio de microarranjo de cDNA, permitiu sua nova classificação em pelo menos cinco sub-grupos distintos: luminal A, luminal B, superexpressão do HER2, basal e normal breast-like (Perou, Sorlie *et al.*, 2000). O subtipo luminal A apresenta fenótipo RE positivo e HER2 negativo, o qual está associado à assinatura de melhor prognóstico e responde à terapêutica com antiestrogênicos (Sorlie, Perou *et al.*, 2001). O subtipo luminal B, cujo fenótipo é RE positivo e HER2 positivo, está associado a pior prognóstico, principalmente relacionado à recidiva tumoral, por apresentar possíveis similaridades com os tumores RE negativos (Sorlie, Perou *et al.*, 2001). O subtipo superexpressão do HER2, cujo fenótipo é RE negativo e HER2 positivo, apresentando boas respostas a drogas que bloqueiam a atividade do HER2, como o trastuzumab (Bertucci, Birnbaum *et al.*, 2006). O subtipo basal apresenta fenótipo RE negativo e HER2 negativo, sendo caracterizado pela expressão de vários genes expressos nas células progenitoras ou células

basais/mioepiteliais, como CK5, CK6, CK14, CK17, receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), P-caderina e p63 (Nielsen, Hsu *et al.*, 2004). Este perfil está ligado a mutações genéticas no gene *BRCA1*, e tem associação com pior prognóstico por não possuir alvo terapêutico definido, como os outros subtipos (Bertucci, Birnbaum *et al.*, 2006; Paredes, Lopes *et al.*, 2007).

1.3. EPIGENÉTICA

O termo epigenética foi utilizado pela primeira vez por Conrad Waddington, definindo as interações entre o genoma e o ambiente que levam a formação do fenótipo (Waddington, 1942). Atualmente a epigenética é empregada para descrever todas as mudanças reversíveis (Feinberg e Tycko, 2004) e herdáveis no genoma que não alteram a sequência de nucleotídeos do DNA (Momparler, 2003). A introdução deste termo leva à abrangência da concepção da unidade hereditária, não sendo mais apenas a sequência de DNA do gene, mas também as modificações covalentes que ele mesmo ou a cromatina a qual está envolvido sofrem (Bird, 2002). As três principais alterações epigenéticas conhecidas são: metilação do DNA, modificações pós-traducionais das histonas e ação de RNAs não codificadores (ncRNAs). Todos atuam de alguma forma na regulação e modificação da expressão gênica da célula.

1.3.1. RNAs não codificantes – ncRNAs

RNAs não codificantes (ncRNAs) são todas as moléculas de RNA que não são traduzidas em proteínas. Entre eles, temos os RNAs ribossomais (rRNAs), os RNAs transportadores (tRNAs), os grandes RNAs regulatórios e os pequenos RNAs regulatórios, e formando um subgrupo destes últimos encontramos os pequenos RNAs nucleolares (snoRNAs), os microRNAs (miRNAs) e os pequenos RNAs de interferência (siRNAs) (Mattick e Makunin, 2006).

As funções dos rRNAs e tRNAs na síntese protéica já são bem conhecidas e estabelecidas. Mas as funções dos RNAs de interferência ainda estão sendo esclarecidas, sendo que há apenas 12 anos foram reportados pela primeira vez (Fire, Xu *et al.*, 1998). Possuem uma ampla gama de funções biológicas, principalmente em eventos epigenéticos, tais como silenciamento

da cromatina e de regiões repetidas do genoma, na dinâmica dos cromossomos, direcionamento da metilação do DNA, inativação do cromossomo X na compensação de dose nas mulheres, modificações nos RNAs, tais como processamento, inibição da tradução e degradação de RNA mensageiro (mRNA) (Mattick e Makunin, 2006; Costa, 2008).

Os miRNAs são, como o próprio nome diz, de pequeno tamanho, 18 a 25 nucleotídeos e são derivados dos *hairpins*, ou dobras de RNA. Os miRNAs atuam na repressão da tradução através de um pareamento perfeito ou não perfeito com a molécula de RNA mensageiro (mRNA) alvo, que leva à sua marcação e degradação pelo complexo RISC (*RNA-induced silencing complex*) ou a parada da tradução, respectivamente. Estima-se que um terço dos genes humanos codificantes de proteínas sejam controlados pelos miRNAs (Du e Zamore, 2005). Os siRNAs participam principalmente na manutenção do silenciamento da cromatina (heterocromatina) (Mattick e Makunin, 2006).

1.3.2. Modificações covalentes das histonas

Histonas são proteínas que fazem parte dos nucleossomos e contêm um domínio C-terminal e uma cauda N-terminal não estruturada (Luger, Mader *et al.*, 1997). A cauda N-terminal das histonas pode sofrer uma variedade de modificações pós-traducionais de resíduos específicos, incluindo metilação, acetilação, ubiquitinação, ribolisação, citrulinação e fosforilação entre outros (Figura 3) (Kouzarides, 2007). Tais modificações regulam diversos processos celulares, como transcrição, replicação e reparo do DNA (Kouzarides, 2007).

Diversas enzimas participam da adição e remoção de modificações covalentes nas histonas. As modificações mais bem conhecidas são a acetilação e metilação das histonas. As histonas acetiltransferases (HATs) e as histonas metiltransferases (HMTs) adicionam grupos acetil e metil, respectivamente, enquanto que as histonas desacetilases (HDACs) e as histonas demetilases (HDMs) removem os grupos acetil e metil, respectivamente (Shi, 2007; Haberland, Montgomery *et al.*, 2009). Essas modificações atuam principalmente alterando a conformação da cromatina, liberando ou impedindo o acesso ao DNA para a maquinaria da transcrição (Gronbaek, Hother *et al.*, 2007).

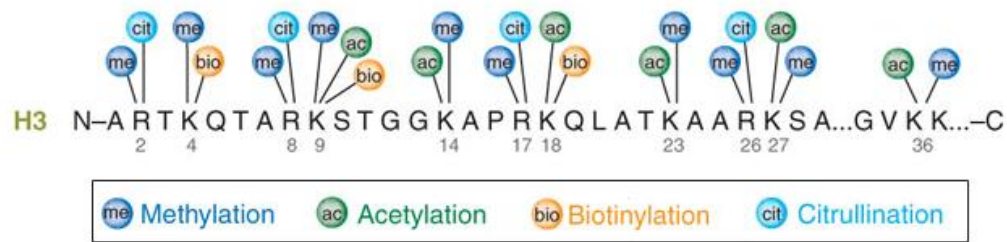


FIGURA 3: MODIFICAÇÕES COVALENTES NA HISTONA H3. Exemplos das possíveis modificações, incluindo metilação, acetilação, biotinilação e citrulinação de resíduos específicos da histona H3.

Fonte: Adaptado de Bhaumik, Smith *et al.*, 2007

É proposto que as modificações das histonas formam um conjunto de códigos que determinam a estrutura e atividade de diferentes regiões da cromatina. Essas modificações atuam na acessibilidade da cromatina, recrutando ou inibindo proteínas efetoras responsáveis pela leitura deste código (Jenuwein e Allis, 2001; Lee, Smith *et al.*, 2010). O mecanismo através do qual se realiza tal decodificação ainda não é bem compreendido.

Diversos estudos vêm desvendando os padrões da localização e das combinações do código das histonas e isso tem aumentado a compreensão de como tais modificações atuam coordenadamente regulando a expressão gênica globalmente (Barski, Cuddapah *et al.*, 2007; Wang, Zang *et al.*, 2008). Como exemplo temos a cauda terminal da histona H3, que pode aparecer em diferentes estados de modificações envolvendo metilação do resíduo de lisina 9 (Lys⁹) e fosforilação do resíduo de serina 10 (Ser¹⁰). A fosforilação da Ser¹⁰ inibe a metilação da Lys⁹, mas é sinergicamente acoplada com a acetilação das Lys^{9/14} durante estímulos mitogênicos e hormonais nas células de mamíferos (Rea, Eisenhaber *et al.*, 2000). Neste estado fosforilado-acetilado, a cauda H3 sinaliza para ativação transcricional. Por outro lado, quando há metilação aberrante da Lys⁹ há antagonismo à fosforilação da Ser¹⁰, levando a disfunção mitótica do cromossomo (Rea, Eisenhaber *et al.*, 2000; Bannister, Zegerman *et al.*, 2001).

Alguns tipos celulares possuem um padrão específico de modificação nas histonas, o qual pode servir também para contribuir na determinação da identidade celular (Bernstein, Meissner *et al.*, 2007; Ringrose e Paro, 2007). Alguns padrões de modificações de histonas podem participar também dos mecanismos que levam à “escolha” do destino das células oriundas da divisão

de uma célula-tronco, visto que uma delas continua a proliferar, enquanto que a outra se diferencia (Jenuwein e Allis, 2001).

1.3.3. Modificação do DNA: metilação

Uma das modificações epigenéticas mais bem conhecida sem eucariontes é a metilação do carbono 5 de citosinas adjacentes a guaninas, os chamados dinucleotídeos CpG (Bird, 2002). A metilação ocorre quando um grupo metil oriundo da 5-adenosilmetionina (SAM – doador universal de metil) é adicionado à posição 5 do anel pirimídico da citosina (C), gerando a 5-metilcitosina (m^5C), processo este catalisado pelas enzimas DNA Metiltransferases (DNMTs) (Figura 4).

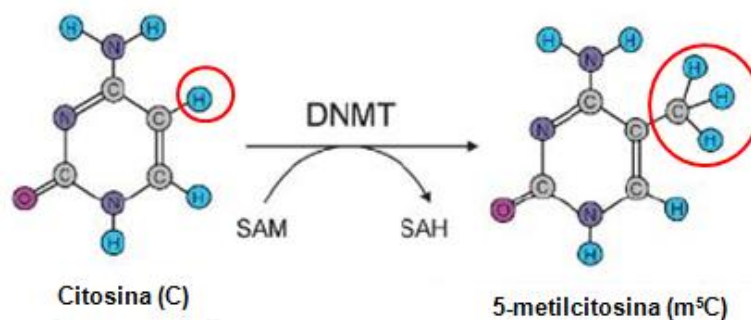


FIGURA 4: METILAÇÃO DA CITOSINA. Os resíduos de citosina no DNA podem ser convertidos para 5-metilcitosina pelas DNMTs. O grupo metil é oriundo da S-adenosil-metionina (SAM), que é convertida para S-adenosilhomocisteína (SAH).

Fonte: Adaptado de Gronbaek, Hother *et al.*, 2007.

Durante a replicação do DNA, as marcas de metilação são copiadas da fita molde para a recém sintetizada pela enzima DNMT1, mantendo nas células-filhas os mesmos padrões de metilação da célula-mãe. Já as DNMT3A e DNMT3B atuam na metilação *de novo* durante o desenvolvimento embrionário (Bestor, 2000).

A maquinaria de metilação de DNA é composta por, além das DNMTs, mais um tipo de enzima: as proteínas de ligação à CpG metilado (MDBs-*methyl CpG Binding Domain Proteins*), possivelmente envolvidas na leitura de metilação do DNA (Hendrich e Tweedie, 2003). Durante a embriogênese também é proposta a participação de enzimas DNA demetilases (Mayer, Niveleau *et al.*, 2000), embora até o momento ainda foi descrita a presença de tais enzimas no genoma humano (De Smet e Lorient, 2010).

Nas células normais, a metilação ocorre predominantemente em regiões repetitivas do genoma, como os satélites e os elementos “parasitas” do DNA

(transposons e retrovírus, por exemplo). A metilação do DNA é um mecanismo fundamental no silenciamento da expressão de determinados genes e na manutenção da estabilidade de genoma, em vista da existência da grande quantidade de DNA repetitivo presente no genoma humano (Reik, 2007).

O desenvolvimento de um embrião normal necessita que tanto o genoma paterno quanto materno sejam expressos adequadamente. Enquanto que a maioria dos genes são expressos pelos 2 alelos parentais, alguns são regulados e transcritos de maneira monoalélica. Este processo é chamado de *imprinting* gênico e promove uma marcação nesses genes, por metilação do DNA, para serem expressos apenas pelo cromossomo oriundo do pai ou da mãe. Aproximadamente 100 genes “imprintados” já foram identificados no genoma. Enquanto que apenas alguns se localizam individualmente no genoma, a maioria encontra-se em grupos, chamados de *clusters* (Verona, Mann *et al.*, 2003).

Os dinucleotídeos CpG não são distribuídos igualmente ao longo do genoma. Existem regiões específicas onde há uma alta densidade desses dinucleotídeos. Se essa região tiver um tamanho maior do que 0,5 kB de DNA, contendo mais do que 55% de nucleotídeos C + G e for observada uma razão de CpG/CpG esperados maior que 0,65, é então denominada como Ilha de CpG (Gardiner-Garden e Frommer, 1987). As ilhas de CpG encontram-se geralmente posicionadas nas regiões 5' dos genes, ou seja, associadas às suas regiões promotoras (Antequera, 2003). Diversos estudos mostram que existem aproximadamente 29.000 ilhas de CpG no genoma humano (Lander, Linton *et al.*, 2001), levando à estimativa que em torno de 60% dos promotores gênicos possuem ilhas de CpG. No entanto, a maior parte do genoma humano é depletado de CpG e isto pode ser explicado pela instabilidade da m^5C . É bem aceita a teoria de que durante a evolução houve a deaminação hidrolítica espontânea das m^5C , levando a sua transformação em bases timinas (T) e a perda da maioria dos CpGs. Entretanto, nos promotores gênicos, a RNA polimerase permanece freqüentemente associada com a cromatina, fornecendo uma espécie de proteção às citosinas contra a reação de deaminação. Essa é uma hipótese que explica a maior taxa de nucleotídeos CpG nos promotores do que no restante do genoma (Antequera, 2003).

A maioria das ilhas de CpG encontra-se não-metilada em todos os estágios do desenvolvimento de todos os tipos de tecido (Antequera, 2003). Nos casos em que ocorre metilação da ilha de CpG, há repressão da transcrição deste gene, que pode ocorrer através da inibição da ligação dos fatores de transcrição ou por mudança na estrutura da cromatina (Bird, 2002). A ordem na qual esses fatos ocorrem pode variar e ainda não é totalmente esclarecida.

Acredita-se que a cromatina em torno de promotores ativos contém ilhas de CpG não-metiladas que mantêm aberto o acesso para os fatores de transcrição e outros co-ativadores. Já nos promotores inativos não há acesso aos fatores de transcrição, pois os dinucleotídeos CpG encontram-se metilados, associando com uma conformação “fechada” da cromatina (Dworkin, Huang *et al.*, 2009). As citosinas metiladas atraem as MDBs, que por sua vez recrutam as HDACs, promovendo a remoção dos grupos acetil das caudas das histonas, causando a compactação da cromatina. Para finalizar, há ainda a metilação de um resíduo específico de lisina da histona, que é a marca da conformação fechada da cromatina (Figura 5).

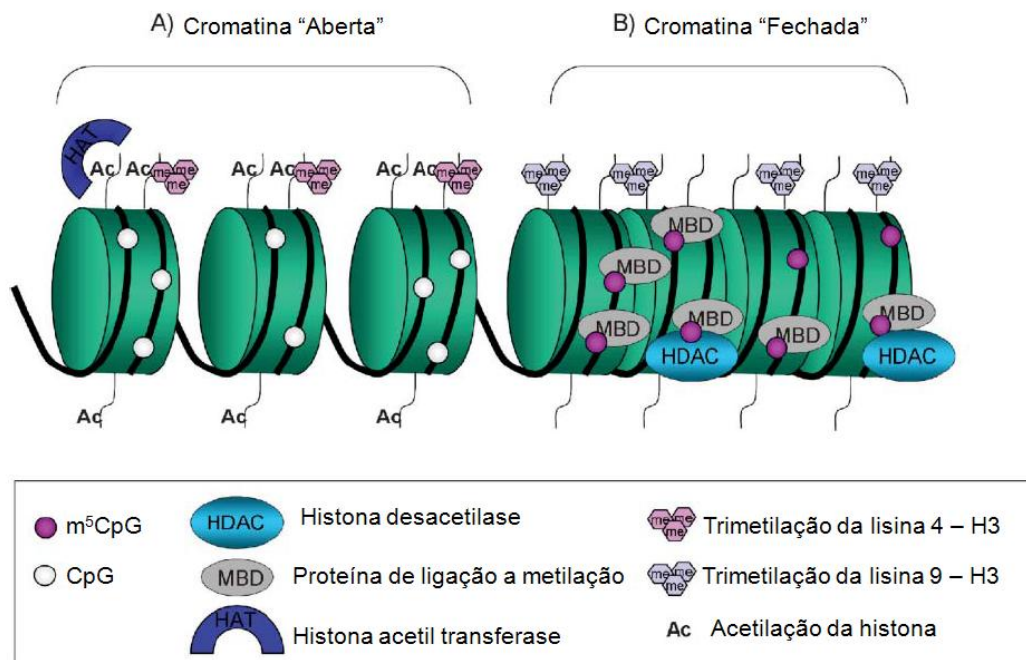


FIGURA 5: ESTRUTURA DA CROMATINA EM PROMOTORES ATIVOS E INATIVOS. A) A cromatina ativa ou “aberta” é caracterizada por apresentar seus dinucleotídeos CpG não metilados e acetilação nas caudas das histonas. B) Quando ocorre a metilação dos CpG, há a ligação das MBDs que atraem HDACs, removendo os grupos acetil das caudas das histonas. Há também a metilação dos resíduos 4 e 9 de lisina das histonas H3. A cromatina passa então para a conformação “fechada”, permanecendo inativa quanto a transcrição gênica

Fonte: Adaptado de Gronbaek, Hother *et al.*, 2007.

1.3.4. Metilação do DNA e câncer

A importância da metilação do DNA é enfatizada em um crescente número de doenças humanas que ocorrem em virtude de anormalidades na manutenção da metilação (Robertson, 2005). A doença onde os eventos epigenéticos tem sido melhor esclarecidos é o câncer.

Em 1983 foi a primeira vez em que a relação entre a metilação do DNA e o câncer foi descrita, quando foi mostrado que o genoma das células tumorais apresentava-se hipometilado em comparação ao das relativas células normais (Feinberg e Vogelstein, 1983).

As células normais apresentam um padrão de metilação do DNA, onde de maneira geral as ilhas de CpG localizam-se nos promotores dos genes e encontram-se freqüentemente desmetiladas, enquanto que os CpG localizados ao longo do genoma, isto é, as regiões pobres em CpG encontram-se metilados na sua maioria (Figura 6).

As alterações na metilação do DNA são freqüentemente observadas nos tumores humanos (Cheung, Lee *et al.*, 2009). O genoma sofre hipometilação nas regiões pobres em CpG de uma forma global, que desestabiliza os cromossomos e aumenta a taxa de rearranjo cromossômico. Em contraste, em diversas ilhas de CpG, presentes nos promotores gênicos, ocorre hipermetilação local, que leva ao silenciamento de genes supressores de tumor (Figura 6) (Antequera, 2003).

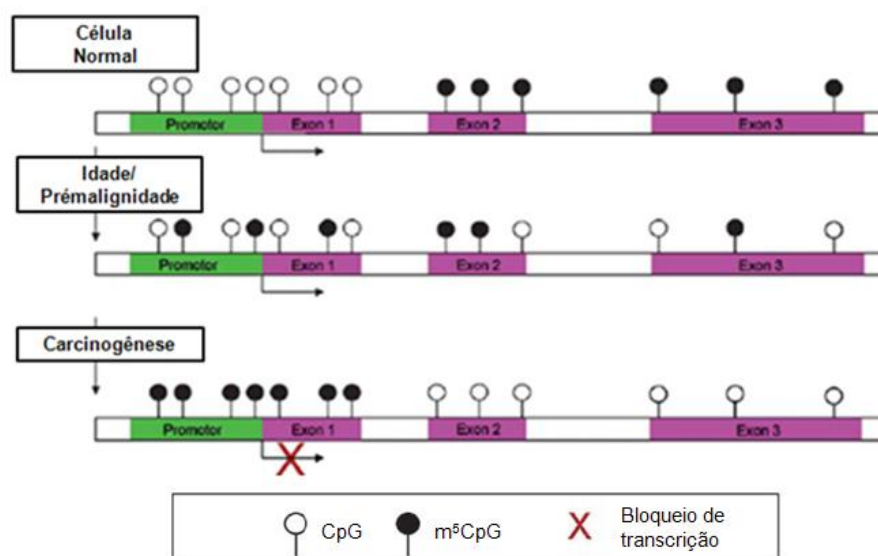


FIGURA 6: PADRÕES DE METILAÇÃO DO DNA. Nas células normais, a metilação do DNA ocorre preferencialmente nos dinucleotídeos CpG presentes ao longo do genoma enquanto

que as ilhas de CpG permanecem não metiladas. Durante o envelhecimento ou em células pré-malignas começa a ocorrer a mudança nos padrões de metilação. Quando as ilhas de CpG, localizadas nos promotores gênicos, tornam-se metiladas, há o bloqueio da transcrição, que pode levar a inativação de genes supressores de tumor.

Fonte: Adaptado de Gronbaek, Hother *et al.*, 2007.

A perda de metilação global nas células tumorais ocorre primeiramente nas regiões repetitivas do genoma (Yoder, Walsh *et al.*, 1997), resultando em uma das marcas da célula tumoral: a instabilidade genômica. Este processo é freqüente em estágios iniciais do câncer e pode estar correlacionado com a severidade da doença (Widschwendter, Jiang *et al.*, 2004).

O mecanismo que leva a hipermetilação das ilhas de CpG ainda não está completamente desvendado. Muitos estudos mostram que pode estar relacionado com interações da DNMT1 com outras proteínas de ligação ao DNA, como Rb, E2F1 e HDAC-1. Esses complexos causam a repressão da transcrição de promotores que contém sítios de ligação E2F em células tumorais (Robertson e Jones, 2000). A DNMT1 também interage com p53, reprimindo a transcrição dos genes responsivos a p53, como IAP (do inglês, proteína inibidora de apoptose) e Cdc25C (Esteve, Chin *et al.*, 2005). Já foi estabelecido que a super expressão da DNMT1 serve como marca para alguns tipos de câncer, como o de próstata (Patra, Patra *et al.*, 2001) e de endométrio (Xiong, Dowdy *et al.*, 2005).

Em tumores humanos, o primeiro gene retratado por estar hipermetilado na ilha de CpG da sua região promotora foi o gene retinoblastoma (Rb) (Greger, Passarge *et al.*, 1989). Desde então, diversos genes tem sido reportados como hipermetilados no câncer e a maioria deles está envolvida em diversas vias do desenvolvimento e da progressão do tumor. Eles regulam diversos processos celulares, incluindo o ciclo celular (CCDKN2A/ p16-INK4, CDKN2B/p15-INK4B, CCND2, RB1), reparo de DNA (MGMT, BRCA1, MLH1), apoptose (DAPK, TMS1, TP73), metástases (CDH1, CDH13, PCDH10), resposta hormonal (ESR1, ESR2), sinalização via Ras (RASSF1) e sinalização Wnt (APC, DKK1) (Cheung, Lee *et al.*, 2009). Alguns tipos celulares parecem ser mais vulneráveis às aberrações na hipermetilação do DNA. Entre elas estão as células do pulmão, estômago, reto, cérebro, fígado, mama e próstata (Ongenaert, Van Neste *et al.*, 2008).

1.4. METALOPROTEASES DE MATRIZ – MMPs

As metaloproteases de matriz (MMPs), também conhecidas como matrinas, foram identificadas em 1962 em um trabalho que mostrava atividade colagenolítica em tecidos de girinos (cauda, pele, intestino e guelras) que estavam passando por metamorfose (Gross e Lapiere, 1962). Nesses tecidos ocorre um rápido remodelamento da MEC, provocando apoptose, diferenciação e crescimento celular (Shi, Li *et al.*, 1998). A partir de tecido de reumatismo sinovial, foi purificada a primeira colagenase, que clivava colágeno do tipo I em um único sítio (Woolley, Glanville *et al.*, 1975). Somente após 11 anos houve a dedução da estrutura primária da colagenase humana de fibroblastos (MMP1) através da técnica de clonagem de cDNA (Goldberg, Wilhelm *et al.*, 1986). Diversos estudos posteriores ajudaram em sua descrição, mostrando seu papel na clivagem de diversos substratos da MEC (Shapiro, 1998; Nagase e Woessner, 1999; Keller, Aga *et al.*, 2009).

Desde a primeira menção a este grupo de enzimas, há 48 anos, foram identificadas pelo menos 25 MMPs diferentes nos vertebrados, e destas 24 estão presentes em humanos (Puente, Sanchez *et al.*, 2003). A importância de sua atividade proteolítica é clara em diversos processos celulares, como proliferação, migração, adesão e nas situações em que se faz necessário o remodelamento tecidual, como angiogênese, desenvolvimento ósseo, cicatrização, involução mamária e uterina, entre outros (Page-Mccaw, Ewald *et al.*, 2007; Rowe e Weiss, 2008). Entretanto, o que vem atraindo mais a atenção de pesquisadores nos últimos anos é, sem dúvida, sua relevante participação em um grande número de patologias, como câncer, doenças vasculares e diversos tipos de doenças inflamatórias (Hu, Van Den Steen *et al.*, 2007; Lopez-Otin e Matrisian, 2007).

1.4.1. Estrutura e função

As MMPs pertencem a um grupo maior, o das peptidases. Peptidases são enzimas que hidrolisam ligações peptídicas, sendo as exopeptidases hábeis em remover aminoácidos terminais, enquanto que as endopeptidases possuem como substrato as ligações peptídicas internas. Todas as MMPs são endopeptidases e possuem um átomo de zinco e um resíduo conservado de metionina no sítio ativo, classificando-as em um subgrupo das proteases

chamado de “Metzincin” (met – metionina; zinc – zinco) (Bode, Gomis-Ruth *et al.*, 1993; Stocker, Grams *et al.*, 1995).

Todos os membros da família MMP compartilham uma estrutura básica comum, composta por um peptídeo sinal (Pre), um pró-domínio (Pro), um domínio catalítico e um domínio onde se encontra o sítio ativo altamente conservado (Figura 7). O sítio catalítico contém um motivo com três resíduos de histidina, os quais são ligantes do zinco e ainda um resíduo de ácido glutâmico. O pró-domínio é responsável pela manutenção do estado de latência da enzima, através de ligação com o domínio catalítico. A maioria das MMPs é secretada na sua forma inativa, ou zimogênio, e sofre ativação no meio extracelular através da clivagem proteolítica do pró-domínio. As MMPs possuem ainda um domínio homólogo à hemopexina, que atua na interação enzima-substrato, auxiliando na sua especificidade, assim como na ligação com seus inibidores. Este domínio não é observado nas MMPs -7, -23 e -26.

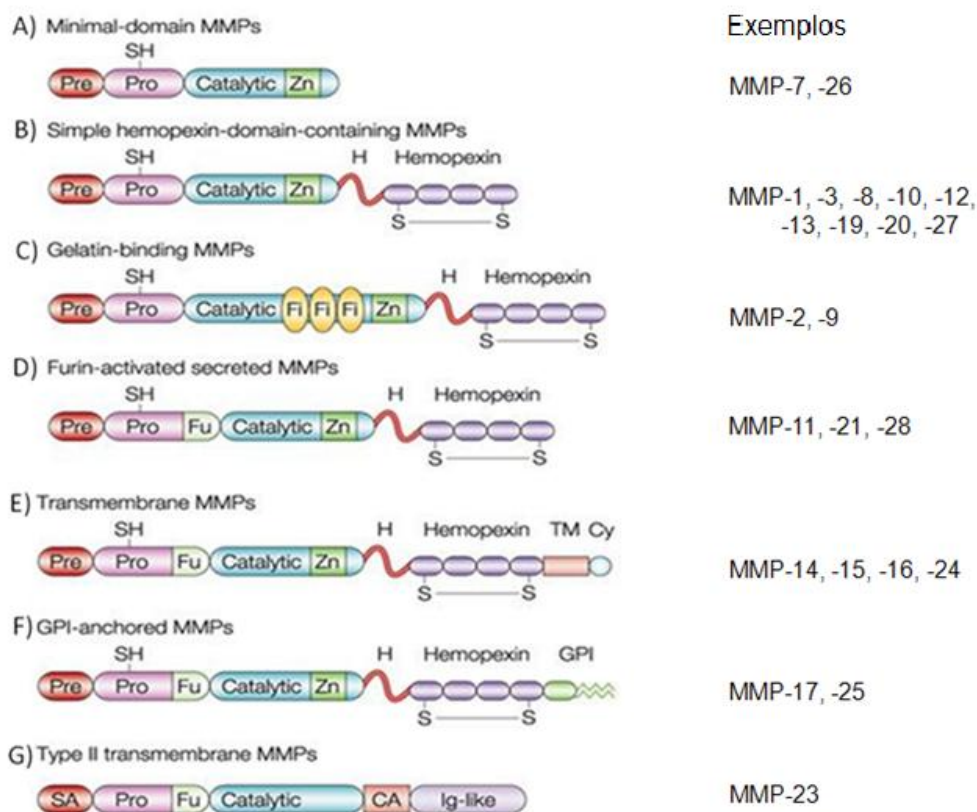


FIGURA 7: ESTRUTURA DE DOMÍNIOS DAS MMPs. A) Estrutura mínima de domínios das MMPs, contendo uma sequência sinal N-terminal (Pre), um propeptídeo (Pro) que faz interação através do (SH) com zinco (Zn) do sítio catalítico. B) Presença do domínio homólogo à hemopexina conectada aos domínios mínimos por uma dobra, representada por H. A primeira e a última das 4 repetições neste domínio são unidos por ligação dissulfeto (S-S). C) MMPs de ligação à gelatina contendo domínios que se parecem com repetições de fibronectina (Fi). D)

MMPs ativadas pela furina contendo um motivo semelhante à furina (Fu) entre seus propeptídeos e domínios catalíticos. Este motivo é também encontrado nas MMPs acopladas a membrana (MT-MMPs) (E e F). As MT-MMPs incluem as MMPs com domínio transmembrana (TM) (E), as MMPs ancoradas ao domínio glicosilfosfatidilinositol (GPI) (F) e o domínio transmembrana tipo II, com sinal âncora (SA) de ligação à membrana (G).

Fonte: Adaptado de Egeblad e Werb, 2002.

A classificação mais aceita das MMPs é a em que se emprega critérios funcionais e estruturais. Essa classificação divide as MMPs em seis grandes grupos, dos quais quatro relacionam a preferência das enzimas frente aos substratos (colagenases, gelatinases, estromelinas e matrilisinas). O quinto grupo compreende as MMPs ancoradas na membrana plasmática (MT-MMPs), e o sexto grupo as MMPs que não se inserem em nenhuma das classificações anteriores.

As MMPs -1, -8 e -13 pertencem ao grupo das colagenases, sendo também designadas de colagenases -1, -2 e -3, respectivamente. Elas iniciam a degradação em sítios específicos de diversas fibras nativas de colágeno, incluindo os de tipo I, II, III e VII, que são rapidamente desnaturados em gelatina à temperatura corpórea.

As gelatinases A e B, denominadas MMPs -2 e -9, respectivamente, degradam preferencialmente colágeno tipo IV, presente nas membranas basais, e gelatina, proveniente da degradação primária de colágeno pelas colagenases (Stamenkovic, 2000). Ambas possuem um domínio semelhante a fibronectina que facilita na ligação à gelatina (Amalinei, Caruntu *et al.*, 2007).

As MMPs -3, -10 e -11, pertencentes ao grupo das estromelinas, apresentam a mesma estrutura de domínios que as colagenases, mas não degradam os colágenos intersticiais. As MMPs -3 e -10 promovem a clivagem de numa vasta gama de substratos, entre eles colágeno tipo IV, V, IX e X, fibronectina, laminina, elastina, gelatina e proteínas com núcleo proteoglicano (Stamenkovic, 2000). Participam também da ativação de algumas pro-MMPs. Já a MMP-11 apresenta fraca atividade proteolítica e sua ativação decorre da ação da furina ainda no meio intracelular (Murphy, Segain *et al.*, 1993).

O grupo das matrilisinas é composto pelas MMPs -7 e -26, que não apresentam o domínio hemopexina, sendo, portanto, os menores membros da família das MMPs. Degradam fibronectina, laminina, colágeno tipo IV, proteínas

com núcleo proteoglicano e algumas moléculas de superfície celular (Parks, Wilson *et al.*, 2004).

As metaloproteases ancoradas à membrana plasmática (MT-MMPs) são divididas em três subtipos, de acordo com o domínio de ancoragem à membrana. São eles o domínio transmembrana tipo I, nos quais estão englobadas as MMPs -14, -15, -16 e -24; o domínio glicosilfosfatidilinositol (GPI), presente nas MMPs -17 e -25; e o domínio transmembrana tipo II, encontrado somente na MMP-23. Todas são ativadas pela ação da furina no meio intracelular e então seguem para a membrana plasmática, onde são ancoradas. Com exceção da MMP-24, as demais MT-MMPs podem clivar o pró-domínio de algumas MMPs, tornando-as ativas (Ohuchi, Imai *et al.*, 1997).

Há sete matrizinas não catalogadas em nenhum outro grupo que podem ser revisadas em Murphy e Nagase, 2008.

A função das metaloproteases era atribuída somente a sua capacidade de degradar os componentes estruturais da MEC. Entretanto a proteólise promovida pelas MMPs pode criar espaço para que as células migrem, além de regular a arquitetura tecidual, produzir substratos específicos de clivagem que desempenham alguma atividade biológica e podem também ativar, desativar ou modificar sinalizadores moleculares (Sternlicht e Werb, 2001). Muitas células possuem receptores (como as integrinas) para componentes da MEC, e as MMPs podem afetar diversas de suas funções (Streuli, 1999). Assim sendo, direta ou indiretamente as MMPs desempenham uma ampla gama de atividades importantes na fisiologia da célula. Diversos estudos vêm evidenciando que as metaloproteases atuam em diversos processos patológicos, especialmente na invasão de tecidos adjacentes pelas células tumorais, através da quebra da membrana basal, proporcionando assim o surgimento de metástases (Stamenkovic, 2000).

1.4.2. Regulação

Os processos fisiológicos normais de remodelamento, morfogênese e reparo tecidual necessitam da degradação da MEC de maneira precisamente regulada. Como as MMPs participam ativamente nestes processos, é natural que sejam reguladas por diversos mecanismos. A atividade das MMPs é

regulada pelo menos em três níveis: transcrição, ativação proteolítica do zimogênio e inibição da enzima ativa (Murphy e Nagase, 2008).

Em condições fisiológicas, a regulação primária ou transcricional geralmente atua mantendo apenas o nível basal de expressão, observado na maioria das linhagens celulares cultivadas. Entretanto, diversos estímulos externos podem induzir rapidamente a expressão de diversas MMPs. Estes incluem os fatores de crescimento, citocinas e as modificações nas interações célula-célula e célula-matriz (Vu e Werb, 2000).

Mecanismos adicionais na regulação da transcrição das MMPs, entre eles a epigenética, também são importantes. As modificações nas histonas e a metilação de ilhas de CpG nos promotores das MMPs já foram reconhecidas como um eficiente mecanismo de repressão da sua transcrição (Fanjul-Fernandez, Folgueras *et al.*, 2009).

O segundo nível de regulação é a ativação extracelular do precursor latente (zimogênio). Sua latência é mantida pela ligação covalente do propeptídeo com o grupo sulfidril do domínio catalítico. Esta ligação impede a ativação do zinco, que é responsável por promover a quebra das ligações peptídicas dos substratos específicos das MMPs (Stamenkovic, 2000). Sendo assim, enquanto houver interação entre o pró-domínio e o domínio catalítico as MMPs não possuem atividade proteolítica. É necessário que haja a dissociação da ligação entre esses domínios para que ela adquira sua atividade. Os mecanismos *in vivo* ainda não estão totalmente claros. Entretanto, *in vitro* sabe-se que o tratamento das proMMPs com agentes caotrópicos, como organomercuriais, faz com que ocorra a dissociação da ligação covalente entre o zinco e o pró-domínio, expondo seu sítio catalítico e promovendo sua ativação (Stamenkovic, 2000).

O terceiro nível de controle é a inibição da sua atividade enzimática, realizada principalmente pelos inibidores tissulares de metaloproteases, as TIMPs (*Tissue Inhibitors of Metalloproteinases*). São pequenas proteínas de 21 a 28 kDa que realizam ligação dissulfeto através de 12 resíduos conservados de cisteína, aos sítios conservados de ligação com zinco das MMPs ativas, bloqueando especificamente a atividade das MMPs (Gomez, Alonso *et al.*, 1997). São conhecidos quatro membros pertencentes à família TIMP. As TIMPs -1 e -2 que inibem a atividade da maioria das MMPs, enquanto que a

TIMP-3 inibe as MMPs -1, -2, -3, -7, -9 e -13 (Knauper, Will *et al.*, 1996), e a TIMP-4 inibe as MMPs -2 e -7, e as MMPs -1, -3 e -9, em menor proporção (Liu, Wang *et al.*, 1997).

1.4.3. MMPs e câncer

As primeiras evidências para a participação das MMPs no câncer vieram de estudos em modelos animais. Em experimentos de transplante de células tumorais em camundongos, constatou-se que quando havia aumento de expressão de MMPs, as células tumorais benignas adquiriam propriedades malignas. Também foi observado que, quando a expressão ou a atividade das MMPs era reduzida, as células malignas tornavam-se menos agressivas (Coussens e Werb, 1996). Nos estudos de Itoh e colaboradores de 1998 e 1999 foi verificado que células tumorais injetadas em camundongos deficientes em MMPs -2 e -9 apresentavam menor capacidade de colonizar o pulmão (Itoh, Tanioka *et al.*, 1998; Itoh, Tanioka *et al.*, 1999). Assim como, observou-se que em camundongos, o aumento da expressão de MMP-1 e -7 levava a formação de doenças hiperproliferativas, aumentando a susceptibilidade ao câncer (Sternlicht e Werb, 2001). Nas glândulas mamárias o aumento da expressão de MMP-3 ou -14 resulta em tumores de mama espontâneos (Sternlicht, Lochter *et al.*, 1999; Sternlicht e Werb, 2001).

O primeiro papel atribuído às MMPs no câncer foi a promoção de metástases, mais precisamente na criação de um caminho na MEC pelo qual as células tumorais pudessem passar para colonizar tecidos distantes (Liotta, Thorgeirsson *et al.*, 1982). Mas sabe-se que elas podem também afetar a proliferação, adesão e migração celular, não só por degradar a MEC, mas também por liberar os fatores de crescimento e gerar alguns fragmentos ou proteínas funcionais da clivagem da MEC (Noel, Jost *et al.*, 2008).

Enquanto que algumas MMPs são sintetizadas pelas células tumorais (por exemplo, a MMP-7), outras são produzidas predominantemente por células estromais (entre elas as MMP-2 e -9). As células tumorais podem estimular as células do estroma à sua volta a sintetizarem MMPs de maneira parácrina, através da secreção de interleucinas, interferons, EMMPRIN (indutor extracelular de MMPs) e fatores de crescimento (Sternlicht e Werb, 2001). As MMPs secretadas pelas células estromais podem ainda ser recrutadas para a

membrana das células tumorais (Polette, Gilbert *et al.*, 1994). Essa diferença de expressão das MMPs pelos diversos tipos celulares é observada no câncer de mama (Figura 8) (Egeblad e Werb, 2002).

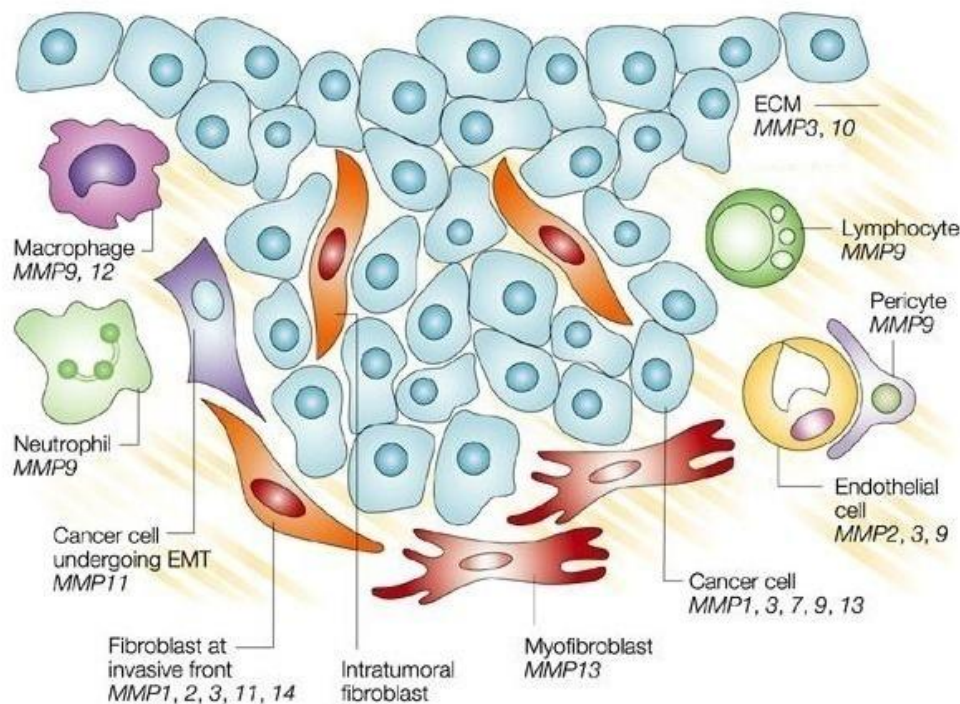


FIGURA 8: EXPRESSÃO DE MMPs EM TUMORES DE MAMA. O câncer de mama consiste de células tumorais e estromais, que incluem os fibroblastos, miofibroblastos, células endoteliais, periócitos, macrófagos, neutrófilos, e linfócitos. Diferentes MMPs são sintetizadas por células estromais e tumorais.

Fonte: Egeblad e Werb, 2002.

Existe uma associação entre a expressão de MMP-9 com um pior prognóstico em tumores de mama (Van'T Veer, Dai *et al.*, 2002). O aumento de sua expressão é observada em células endoteliais pré-malignas no pulmão (Hiratsuka, Nakamura *et al.*, 2002). O aumento da expressão da MMP-2 em carcinomas de bexiga mostrou-se proporcional com sua habilidade em formar metástases nos pulmões (Hua e Muschel, 1996).

Os primeiros passos da invasão, desprendimento e migração das células tumorais, já são influenciados de diversas formas pelas MMPs. A clivagem da laminina-5 pelas MMP-2 e -14 revela seu sítio matricríptico (formas ocultas das moléculas da MEC que podem ser expostas por modificações estruturais), provocando motilidade celular (Giannelli, Falk-Marzillier *et al.*, 1997; Koshikawa, Giannelli *et al.*, 2000). Esta forma clivada da laminina-5 é encontrada em vários modelos experimentais de tumores (Giannelli, Falk-Marzillier *et al.*, 1997). Durante o processo de desprendimento das células

tumorais, o receptor C44 presente nessas células é clivado pela MMP-14 (Kajita, Itoh *et al.*, 2001) e a porção desse receptor que permanece ancorado na célula se liga a outra metaloprotease, a MMP-9, fixando-a na superfície celular. Dessa forma, a célula tumoral consegue invadir tecidos vizinhos e promover angiogênese (Yu, Woessner *et al.*, 2002). A quebra de moléculas de adesão, como a E-caderina (clivada pelas MMP-3 e -7) também é importante neste processo (Noe, Fingleton *et al.*, 2001). As células tumorais apresentam estruturas diferenciadas durante a invasão, chamadas de invadópodes (Nakahara, Howard *et al.*, 1997). Nessas estruturas estão localizadas a MMP-14, ligada através de seu domínio transmembrana (Nakahara, Howard *et al.*, 1997); a MMP-9, ligada ao receptor C44 (Brooks, Stromblad *et al.*, 1996) e a MMP-2, ligada a integrina $\alpha\beta 3$ ou à própria MMP-14 (Brooks, Stromblad *et al.*, 1996). Ensaios experimentais demonstraram que a super expressão de MMP-14 leva ao aumento do número de células tumorais sobreviventes no processo metastático (Tsunetzuka, Kinoh *et al.*, 1996).

De forma geral, as metaloproteases são super expressas devido às mudanças na transcrição dos seus genes, observadas principalmente nos processos cancerosos. Foi observada expressão diferenciada das MMPs em carcinomas de pulmão, cólon, mama e pâncreas (Davidson, Goldberg *et al.*, 1998; Gonzalez-Avila, Iturria *et al.*, 1998; Hashimoto, Kihira *et al.*, 1998; Lochter e Bissell, 1999). Há evidências clínicas mostrando que o aumento dessas moléculas confere um prognóstico ruim para uma variedade de tipos de câncer (Murray, Duncan *et al.*, 1998; Yamamoto, Adachi *et al.*, 1999). Além disso, os níveis de diversas MMPs no plasma e na urina de pacientes com câncer é maior quando comparada com pacientes saudáveis (Zucker, Hymowitz *et al.*, 1999). Portanto, um dos principais interesses nesse grupo de enzimas é a sua utilização como possível biomarcador no câncer (Tabela 2). No câncer de mama, por exemplo, algumas MMPs podem indicar a recorrência tumoral, metástases e resposta a terapia primária e coadjuvante.

TABELA 2: MMPs CANDIDATAS A BIOMARCADORES NO CÂNCER

Tipo de Câncer/ MMPs	Detectado no tecido ou fluido corporal			Métodos de Análise	Referências
Mama					
MMP-13	Tecido			IHQ	(Zhang, Cao <i>et al.</i> , 2008)
MMP-9, TIMP-1	Tecido, soro			ELISA, IHQ	(Wu, Wu <i>et al.</i> , 2008)
MMP-9	Urina, tecido	soro,	plasma,	Zimograma, IHQ	(Ranuncolo, Armanasco <i>et al.</i> , 2003; La Rocca, Pucci-Minafra <i>et al.</i> , 2004; Fernandez, Yan <i>et al.</i> , 2005)
MMP-2	Tecido			Zimograma, IHQ	(Fujiwara, Shibata <i>et al.</i> , 2006)
MMP-1	Tecido, mamilo	aspiração	do	Análise genética	(Poola, Dewitty <i>et al.</i> , 2005)
Pâncreas					
MMP-9	Suco pancreático, soro			ELISA, Imunoblot	(Tian, Cui <i>et al.</i> , 2008)
MMP-2	Suco pancreático, tecido			Zimograma	(Yokoyama, Ochi <i>et al.</i> , 2002)
MMP-7	Tecido, plasma			IHQ, RT-PCR, ELISA	(Kuhlmann, Van Till <i>et al.</i> , 2007)
Bexiga					
MMP-9	Tecido			IHQ	(Papathoma, Petraki <i>et al.</i> , 2000)
MMP-9/MMP-2	Urina			Zimograma	(Gerhards, Jung <i>et al.</i> , 2001)
MMP-9	Urina			Zimograma, ELISA, imunoblot	(Sier, Casetta <i>et al.</i> , 2000)
MMP-9	Urina			Zimograma, citologia	(Eissa, Swellam <i>et al.</i> , 2003)
Pulmão					
MMP-9, TIMP-1	Soro, lavagem brônquica			ELISA	(Jumper, Cobos <i>et al.</i> , 2004; Koc, Ediger <i>et al.</i> , 2006)
MMP-7	Tecido			IHQ	(Liu, Nakano <i>et al.</i> , 2007)
MMP-1	Tecido			Análise genética	(Su, Zhou <i>et al.</i> , 2005; Sauter, Rosenberger <i>et al.</i> , 2008)
Cérebro					
MMP-2	Tecido			IHQ, ELISA, Zimograma	(Sawaya, Yamamoto <i>et al.</i> , 1996; Jaalinoja, Herva <i>et al.</i> , 2000)
MMP-9	Tecido			IHQ, ELISA, Zimograma	(Rao, Yamamoto <i>et al.</i> , 1996; Choe, Park <i>et al.</i> , 2002)
MMP-2, MMP-9	Tecido, urina, cerebrospinal	fluido		IHQ, ELISA, Zimograma	(Friedberg, Glantz <i>et al.</i> , 1998; Smith, Zurakowski <i>et al.</i> , 2008)

Tipo de Câncer/ MMPs	Detectado no tecido ou fluido corporal	Métodos de Análise	Referências
Próstata			
MMP-2, MMP-9	Plasma, tecido	ELISA, IHQ	(Miyake, Muramaki <i>et al.</i> ; Morgia, Falsaperla <i>et al.</i> , 2005)
MMP-2	Tecido	IHQ	(Trudel, Fradet <i>et al.</i> , 2008)
MMP-9	Urina	Zimograma	(Roy, Louis <i>et al.</i> , 2008)
Ovário			
MMP-9	Tecido	Zimograma	(Lengyel, Schmalfeldt <i>et al.</i> , 2001)
MMP-9, MMP-14	Tecido	IHQ	(Kamat, Fletcher <i>et al.</i> , 2006)
MMP-2	Tecido	IHQ	(Perigny, Bairati <i>et al.</i> , 2008)
MMP-2, MMP-9, MMP-14	Tecido	IHQ	(Adley, Gleason <i>et al.</i> , 2009)
Cólon-retal			
MMP-2	Tecido, plasma	IHQ, ELISA	(Langenskiöld, Holmdahl <i>et al.</i> , 2005; Hilska, Roberts <i>et al.</i> , 2007)
MMP-9	Tecido	IHQ	(Cho, Lee <i>et al.</i> , 2007)
MMP-2, MMP-9	Plasma	ELISA	(Tutton, George <i>et al.</i> , 2003)
MMP-7	Soro	ELISA	(Maurel, Nadal <i>et al.</i> , 2007)
MMP-1	Tecido	ELISA	(Baker e Leaper, 2003)
MMP-13	Tecido	Zimograma	(Leeman, McKay <i>et al.</i> , 2002)

Nota: IHQ – Imunohistoquímica; RT-PCR – PCR de transcrição reversa.

1.4.4. Gelatinase A, Metaloprotase-2 ou MMP-2

O gene *MMP2* localiza-se no braço longo do cromossomo 16 (16q13-q21) e sua estrutura completa foi determinada por Pirkko Huhtala e colaboradores (1990). O tamanho do gene é de 31017 pb, contendo 13 éxons em sua sequência. Possui a variante transcricional 1 (NM_004530.4), com transcrito de 3548 pb, e a variante transcricional 2 (NM_001127891.1), com transcrito de 3402 pb.

O promotor do gene *MMP2* possui diversos elementos regulatórios (Figura 9), entre eles uma região de ligação ao fator de transcrição ativador de proteína AP2. Também apresenta o sítio PEA3, sítio de ligação da família de oncoproteínas das ETS (v-etserythroblastosisvirus E26), que atuam como fatores de transcrição (Fanjul-Fernandez, Folgueras *et al.*, 2009).



FIGURA 9: ELEMENTOS REGULATÓRIOS NA REGIÃO PROMOTORA DO GENE *MMP2* HUMANO. O sítio de início de transcrição está indicado pela seta e os elementos regulatórios dentro das caixas coloridas.

Fonte: Fanjul-Fernandez, Folgueras *et al.*, 2009.

Mais recentemente as ilhas de CpG (regiões ricas em dinucleotídeos CG) também têm sido descritas como elementos importantes na regulação de *MMP2*, entre outras MMPs. A hipometilação já foi descrita como ativadora de *MMP2* em câncer de próstata (Shukeir, Pakneshan *et al.*, 2006).

A MMP-2 é sintetizada na forma de pré-proteína nos ribossomos e é então direcionada ao retículo endoplasmático, onde perde seu domínio sinal (pré-domínio). A proteína MMP-2 é liberada das células na forma de zimogênio (proMMP-2), ou seja, requer clivagem pós-traducional extracelular para ganhar atividade biológica, tendo sua forma ativa tamanho de 62 kDa (Roberts, Visser *et al.*, 2002).

Fisiologicamente a MMP-2 é expressa principalmente por fibroblastos (Bjorklund e Koivunen, 2005), sendo sua expressão também regulada pelo indutor extracelular de metaloproteases (EMMPRIN ou CD147), que é uma glicoproteína transmembrana da família das imunoglobulinas (Caudroy, Polette *et al.*, 2002).

Investigações *in vitro* revelaram que a ativação da proMMP-2 necessita da contribuição da MMP-14 e da TIMP-2 (Bjornland, Flatmark *et al.*, 2005). A MMP-14 ativa ancorada na membrana celular atua como um receptor para TIMP-2, que se liga ao sítio ativo da MMP-14. Esse complexo binário atua como um receptor para o domínio homólogo a hemopexina da proMMP-2 (Figura 10). Também é possível gerar a enzima ativa através de um processo auto-catalítico com associação da integrina $\alpha\beta 3$ (Deryugina, Ratnikov *et al.*, 2001).

Apesar das TIMPs terem ação inibitória da atividade das MMPs, a TIMP-2 auxilia na ativação especificamente da MMP-2. O domínio homólogo à hemopexina da MMP-2 parece estar envolvido na modulação da atividade da MMP-2 pelas TIMPs (Figura 10) (Fridman, Fuerst *et al.*, 1992; Murphy, Willenbrock *et al.*, 1992). Estudos sugerem que a concentração de TIMP-2 no meio extracelular pode determinar a inibição ou ativação da MMP-2 (Lafleur, Tester *et al.*, 2003).

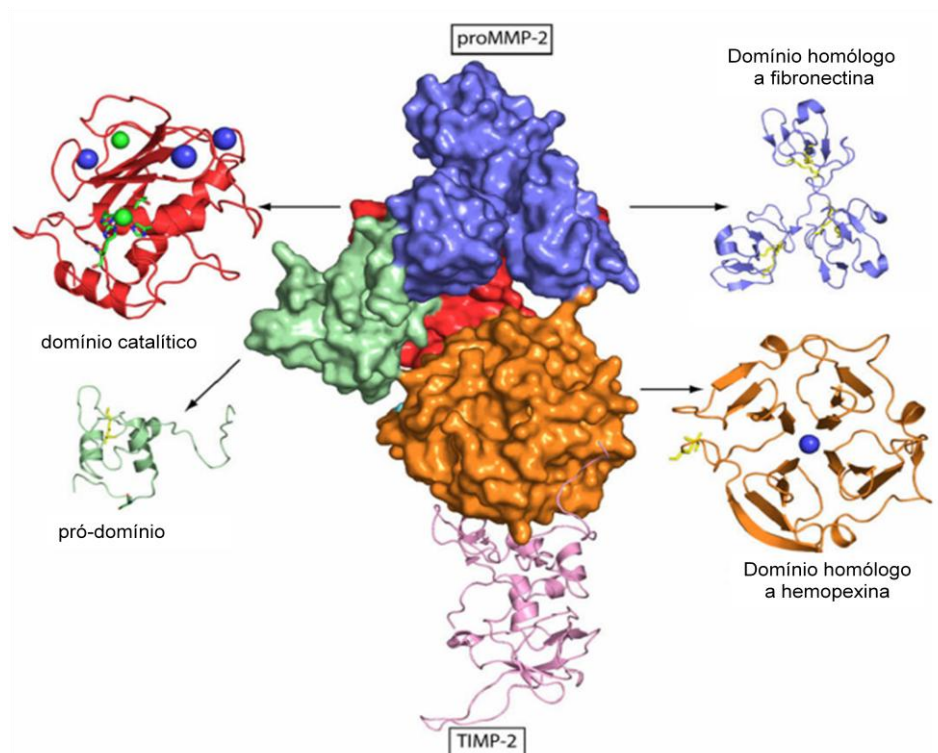


FIGURA 10: DIAGRAMA EM TRÊS DIMENSÕES DO COMPLEXO proMMP-2/TIMP-2. O pró-domínio está mostrado em azul, o domínio catalítico em vermelho, o domínio fibronectina em azul, o domínio homólogo à hemopexina em laranja e a TIMP-2 em rosa. O íon zinco é a esfera verde e o cálcio a esfera azul. As ligações dissulfeto estão representadas em amarelo.

Fonte: Murphy e Nagase, 2008.

As gelatinases (MMP-2 e -9) são as principais MMPs com capacidade de degradar colágeno desnaturado, ou seja, gelatina, pois apresentam o sítio de

ligação à gelatina no domínio homólogo à hemopexina (Banyai e Patthy, 1991; Collier, Krasnov *et al.*, 1992).

Além disso, a MMP-2 também degrada colágeno tipo IV, característica que lhe gerou outra nomenclatura, 72 kDa colagenase tipo IV. O colágeno tipo IV é o principal constituinte das membranas basais e, portanto, a MMP-2 possui habilidade em quebrá-las. A capacidade de degradar gelatina e colágeno tipo IV lhe permite participar de processos que exigem remodelamento da MEC como, por exemplo, nos processos de implantação placentária, organogênese, crescimento e cicatrização (Nagase e Woessner, 1999).

Também é observada a atuação da MMP-2 em diversos processos patológicos, como doenças cardiovasculares (Galis e Khatri, 2002) e na formação e progressão do câncer, envolvendo principalmente invasão tumoral e metástases (Stamenkovic, 2000). Nestes processos é comum que ocorram alterações transcricionais ou de ativação protéica da MMP-2. Foi observado, por exemplo, que a inativação do AP-2 é responsável pelo aumento da expressão de MMP-2 em melanoma, resultando na invasão das células tumorais (Martin, Knowlden *et al.*, 1994). O EMMPRIN também exerce algumas funções durante progressão tumoral, através da estimulação da expressão de MMP-2 (Liang, Xiong *et al.*, 2005).

Em função da participação dessa enzima nos processos de progressão tumoral e desenvolvimento de metástases, nosso grupo de pesquisa interessou-se na análise da regulação epigenética do gene *MMP2* tendo em vista a presença de uma ilha de CpG em sua região promotora. Visto que haviam poucos dados disponíveis na literatura mostrando se essa hipótese poderia estar correta, foram realizados experimentos preliminares para observar as diferenças de expressão do gene *MMP-2* em linhagens celulares tumorais de mama. Foi observado que as linhagens que não expressavam *MMP-2* voltavam a expressá-lo quando tratadas com o agente desmetilante 5-aza-desoxicitidina, sugerindo que a expressão desse gene estaria de fato sendo regulada por hipermetilação do seu promotor.

No decorrer da continuidade deste trabalho, um grupo de pesquisadores liderado por Chernov e colaboradores (2009) publicou dados mostrando pela primeira vez que o gene *MMP-2* é regulada por mecanismos epigenéticos em câncer de mama. Além de seqüenciar linhagens celulares de outros tipos

tumorais, seqüenciaram a ilha de CpG do gene *MMP2* de uma linhagem tumoral de mama MCF7 e a partir desses dados desenharam oligonucleotídeos para reação de MSP (methylation specific PCR). Além disso, verificaram que modificações nas histonas (trimetilação do resíduo de lisina 27 da H3) também interferiam no silenciamento de *MMP2* na linhagem tumoral de mama (Chernov, Sounni *et al.*, 2009).

Os resultados publicados por Chernov e colaboradores (2009) confirmaram nossa hipótese inicial de que a regulação do gene *MMP-2* é realmente regulada por epigenética. Entretanto, nenhuma análise havia sido feita em amostras de tumores primários de mama, o que é importante para validar a hipermetilação do promotor desse gene como marcador molecular do câncer de mama.

Assim sendo, este trabalho teve como objetivo estudar a hipermetilação do gene *MMP2* e sua correlação com dados clínico patológicos em câncer de mama. Além disso, também nos propusemos a avaliar a presença da proteína MMP-2 por imunohistoquímica como um paralelo de correlação com os dados de metilação e provável silenciamento da expressão da proteína.

2. OBJETIVO GERAL

Avaliar a regulação da expressão do gene *MMP2* por metilação do DNA em tumores primários de mama.

2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a expressão do gene *MMP2* em linhagens tumorais de mama por RT-PCR e correlacionar com iniciadores de MSP desenhados por Chernov et al. 2009
- Utilizar a técnica de MSP para avaliar a hipermetilação do promotor do gene *MMP2* em tumores primários de mama
- Analisar a expressão da proteína MMP-2 por imunohistoquímica em tumores primários de mama.
- Correlacionar estatisticamente os dados de metilação e de expressão de MMP-2 entre si e com dados clínico patológicos de tumores de mama.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. MATERIAL BIOLÓGICO

Os materiais biológicos utilizados no estudo foram linhagens tumorais de mama e tumores primários de mama. As linhagens usadas foram MCF7 e HB4a, cedidas pelo Instituto Ludwig de Pesquisa para o Câncer em São Paulo. A MCF7 é uma linhagem tumoral de mama, e HB4a é uma linhagem celular normal de mama imortalizada pelo vírus SV40 (Stamps, Davies *et al.*, 1994).

As amostras de tumores de mama foram gentilmente cedidas pela Dra. Enilze Ribeiro e pelo Dr. Iglénir Cavalli, responsáveis pelo Banco de Tumores do Laboratório de Citogenética Humana e Oncogenética do Departamento de Genética do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná. Todas as amostras catalogadas neste Banco de Tumores são provenientes do Hospital de Clínicas da UFPR (HC-UFPR) e do Hospital Nossa Senhora das Graças (HNSG), cujo responsável é o Dr. Rubens Silveira Lima. As amostras foram obtidas mediante consentimento informado dos pacientes (ANEXO 1) e aprovação do Comitê de Ética, Processo nº 25000.007020/2003-93; registro no CONEP: 7220 e parecer nº 251/2003 de 20/02/2003 do HNSG, Curitiba-PR.

Todas as amostras foram analisadas por anatomopatologistas dos Laboratórios do HNSG ou do HC-UFPR. Os resultados obtidos aqui descritos foram coletados dos laudos das pacientes e estão de acordo com critérios estabelecidos na literatura. Alguns desses laudos são derivados da avaliação subjetiva da observação das amostras por microscopia óptica (tipo e grau histológico, percentagem de células visualizadas com marcadores de imunohistoquímica).

Foram analisadas 25 amostras de tumor de mama obtidas de pacientes do sexo feminino com idade média de $56,7 \pm 14,3$ anos (37 a 83 anos). Todas as amostras selecionadas correspondiam a carcinomas ductais invasivos contendo porções *in situ* e em nenhum caso havia associação com outros tipos histológicos. O grau histológico foi determinado de acordo com o critério de Bloom-Richardson. Segundo esse critério, 20% das amostras eram de grau I, 40% de grau II e 40% de grau III. A análise de linfonodos foi realizada em 92% do total das amostras (n=23). Desse total, 56,52% (n=13) apresentaram linfonodos positivos. O segundo estadiamento, denominado TNM, foi feito de acordo com a classificação oficial (Barros, Barbosa *et al.*, 2001). Os testes de

marcadores moleculares, feitos por imunohistoquímica (IHQ), foram mostrados nos laudos em percentagem de células coradas. Os dados de HER2 (ERBB2) foram obtidos com a utilização do kit de IHC HercepTest™ (DAKO A/S, grostrup, Dinamarca).

3.2. CULTIVO DE CÉLULAS

O cultivo das linhagens foi realizado em meio RPMI1640 (Gibco) suplementado com soro fetal bovino (SFB) 10% e antibióticos como garamicina (40 µg/ml) para evitar contaminação bacteriana, ciprofloxacina (10 µg/ml) para evitar contaminação com espécies do gênero *Mycoplasma* e anfotericina B (2,5 µg/ml) para evitar contaminação por fungos e leveduras. A linhagem HB4a recebeu suplementação de insulina (5 µg/ml) e hidrocortisona (100 µg/ml). O início do cultivo das linhagens foi feito com amostras contendo 10^6 células retiradas do estoque armazenado em nitrogênio líquido. Realizou-se o descongelamento a 37°C e as células foram repassadas dos tubos criogênicos para um tubo de 15 ml contendo 2 ml de meio RPMI 1640. Os tubos foram centrifugados a 700 x g por 3 min, o sobrenadante contendo dimetil-sulfóxido (DMSO), agente tóxico à célula, mas importante para manter sua integridade no congelamento, foi retirado e as células foram ressuspensas em 1 ml de meio RPMI suplementado e transferidas para garrafa pequena (24 cm³) contendo 3 ml de meio de cultura. Os frascos foram então incubados em estufa com tensão de CO₂ a 5% e a 37°C. O meio de cultura foi regularmente substituído em dias alternados dependendo da linhagem (HB4a ou MCF7) e número de células mortas visualizadas.

Quando a confluência das células nas garrafas T25 era de aproximadamente 90%, foi realizada a expansão para a garrafa T75. Neste processo, as células foram tratadas com TrypLE™ Express (Gibco) (tripsina 0,25%) em uma quantidade suficiente para cobrir a superfície da garrafa aonde as células estavam aderidas e posteriormente foram incubadas por 3 a 5 minutos em estufa a 37°C. quando as células se soltavam era adicionado o dobro de meio de cultura, para diluição da tripsina. As células desagregadas foram então transferidas para tubos de 15 mL e centrifugadas a 700 x g por 3 min. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 1 mL

de meio de cultivo RPMI 1640 novo e completo e transferidas para a nova garrafa e incubadas na estufa de CO₂.

3.3. AVALIAÇÃO DO PADRÃO DE TRANSCRIÇÃO DO GENE *MMP2* POR RT-PCR NAS LINHAGENS DE MAMA

3.3.1. Extração de RNA

O RNA total foi isolado de um número aproximado de 4×10^6 células utilizando *TRIzol Reagent* (Life Technologies, USA), segundo especificações do fabricante e confere uma adaptação do método desenvolvido por Chomczynski, P. em 1987 (Chomczynski e Sacchi, 1987). O método consiste de uma lavagem inicial das células na garrafa com PBS 1X (137 mM NaCl; 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄; 2 mM KH₂PO₄), adição de *TRIzol Reagent* 1ml para cada 10cm² de área contendo as células aderidas seguido por incubação por 5 minutos à temperatura ambiente. O lisado de células foi distribuído em aliquotas de 1 ml para tubos contendo 250 µL de clorofórmio. Os tubos foram homogeneizados por inversão e centrifugados à 8100 x g por 4°C durante 20 min. A fase aquosa foi coletada para um novo tubo aonde foi adicionado 500 µL de isopropanol e incubado a -20°C por cerca de 18 horas. O RNA total precipitado foi obtido após a centrifugação à 8100 x g por 10 minutos a 4°C, e em seguida o RNA precipitado foi lavado com etanol 75% diluído em água tratada com DEPC 0,1% (dietilpirocarbonato). Após a lavagem o RNA foi seco em temperatura ambiente e solubilizado em aproximadamente 30 µL de água tratada com DEPC. Todo procedimento foi realizado segundo especificações contidas no manual de Biologia Molecular (Sambrook e Russel, 2001).

A quantificação do RNA total extraído foi feita em espectrofotômetro Nanodrop com comprimento de onda equivalente a 260 nm, considerando que 1 DO_{260nm} equivale a 40 µg/ml de RNA. A relação entre as leituras realizadas a 260 e 280 nm foi utilizada como parâmetro na estimativa do grau de contaminação do RNA por proteínas. A integridade dos RNAs extraídos foi verificada através da eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo 0,2 µg/ml. O RNA foi preparado com tampão de amostra desnaturante contendo uréia 7M e glicerol 30%. As amostras consideradas íntegras foram as que apresentaram as bandas correspondentes aos RNAs ribossômicos 28S e 18S bem evidentes.

3.3.2. Obtenção da Primeira Fita de cDNA

Aproximadamente 500 ng de RNA total foram utilizados para transcrição reversa à primeira fita de cDNA na presença de 200 U da enzima transcriptase reversa (Superscript II, Gibco BRL), utilizando 25 pmoles do iniciador OLIGO dT em uma reação com volume final de 20 de μL contendo solução tampão 1X, 25 U de inibidor de RNase (Promega) e 200 μM de dNTPs. Inicialmente incubou-se a mistura de RNA, água ultra pura estéril e o iniciador a 65°C por 5 min para abertura de possíveis estruturas secundárias do RNA. A reação de síntese de cDNA foi realizada com 1 ciclo de 42°C por 60 min, seguida de um ciclo a 72°C por 15 min.

O gene de expressão constitutiva *GAPDH* foi utilizado como controle para analisar a eficiência de síntese e qualidade do cDNA nas amostras. A reação de RT-PCR foi realizada com 1 μL de cDNA em um volume final de 20 μL contendo tampão 1X de PCR (Invitrogen), 1,5 mM MgCl_2 , 200 μM dNTPs, 1U *Taq* Platinum (Invitrogen) e 8 pmoles de cada iniciador específico. Os iniciadores usados foram *GAPDH* universal 5' CTG CAC CAC CAA CTG CTT A e *GAPDH* reverso 5' CAT GAC GGC AGG TCA GGT C, utilizando-se das seguintes condições de amplificação: 10 minutos a 95°C seguida por 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 45 segundos, anelamento a 63°C por 45 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto. Finalizando com um último ciclo de extensão de 5 minutos a 72°C.

3.3.3. RT-PCR do gene *MMP2* nas Linhagens de Mama

Iniciadores específicos para o gene *MMP2* foram desenhados próximos da extremidade 3' da molécula de RNAm e foram utilizados nas reações de RT-PCR para avaliar o padrão de expressão nas linhagens de mama. O programa Oligotech (disponível em <http://www.oligoset.com/analysis.php>) foi utilizado como ferramenta para o desenho dos iniciadores. A reação foi realizada em um volume final de 20 μL , contendo 1 μL de cDNA, tampão 1X de PCR (Invitrogen), MgCl_2 1,5 mM, dNTPs 200 μM , 1 U *Taq* Platinum (Invitrogen) e 8 pmoles de cada um dos iniciadores específicos.

Os iniciadores utilizados foram: RTMMP2F - 5' TAC ACC TAC ACC AAG AAC TTC e RTMMP2R – 5' GTC CTT GAA GAA GAT CTC 3'. As condições

utilizadas foram as seguintes: 5 minutos a 95°C seguida por 35 ciclos a 94°C por 30 segundos, 50°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos. Finalizando com um último ciclo de extensão à 72°C por 5 minutos.

3.3.4. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida 8%.

Os produtos das reações de RT-PCR das linhagens e dos tumores produtos das reações de MSP foram avaliados em géis de poliacrilamida à 8% confeccionados a partir de uma solução de acrilamida e bis-acrilamida na proporção 29:1, tetrametiletilenodiamina (TEMED) a 0,1% (Life Technologies) e persulfato de amônio (APS) a 0,1%. As eletroforeses foram conduzidas a 100 V por aproximadamente 1 hora. A revelação dos resultados foi feita pela impregnação com nitrato de prata segundo o método de Sanguinetti e colaboradores (Sanguinetti, Dias Neto *et al.*, 1994).

3.4. ANÁLISE DO PERFIL DE METILAÇÃO DO GENE *MMP2*

3.4.1. Extração de DNA

As células das linhagens HB4a e MCF7 foram usadas para obtenção do DNA genômico extraído pelo método de fenol/clorofórmio (Sambrook e Russel, 2001). Quando as células atingiam confluência maior que 90% em garrafa T75, eram destacadas através do tratamento com tripsina, concentradas por centrifugação e submetidas à digestão por 18 horas em 4 mL de tampão TES (Tris/HCl 1M; EDTA 0,5M e SDS 10%) contendo Proteinase K 100 µg/mL. Foi adicionado um volume de fenol/clorofórmio e, após a obtenção de uma emulsão homogênea, a mistura foi centrifugada a 700 x g por 10 minutos. O processo foi repetido até ser obtida uma fase aquosa transparente livre de proteínas. Depois da recuperação da fase aquosa para um novo tubo falcon, o DNA foi tratado com acetato de sódio 3M (1/10 do volume total), pH 5,0 por 18 horas e com dois volumes de etanol absoluto a -20°C. Após centrifugação à 4°C e à 81000 x g por 30 minutos o precipitado de DNA foi lavado com etanol 70%, seco em estufa a 37°C e ressuspenso em água ultrapura estéril (filtrada em sistema Millipore) e armazenado à aproximadamente 6°C. A quantidade e a qualidade do DNA obtido foram avaliadas através de leituras em espectrofotômetro Nanodrop® e gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo 0,2 µg/mL, respectivamente.

3.4.2. Tratamento de DNA com Bissulfito de Sódio

As amostras de DNA quantificadas foram submetidas ao tratamento com bissulfito de sódio. Este agente promove a deaminação de citosinas transformando-as em uracilas. No entanto as citosinas metiladas não sofrem essa reação porque o grupamento metil confere proteção nos tempos usados na técnica. Após a reação de PCR, as uracilas são substituídas por timinas, sendo possível diferenciar as citosinas inicialmente metiladas das não metiladas. O procedimento foi realizado utilizando o kit Epitect® Bissulfite (Qiagen®), seguindo as especificações do fabricante.

Para avaliar a eficácia do tratamento do DNA, foi realizada a reação controle *nested*-PCR para a sequência satélite SATR-1 (Costa, Paixao *et al.*, 2006). Esta região do DNA humano possui muitas citosinas não metiladas que serão convertidas em nucleotídeos timinas. Assim, se as amostras forem eficazmente tratadas, os iniciadores para a sequência SATR-1 se anelarão, caso contrário, os iniciadores não serão capazes de se anelar, não havendo a amplificação do fragmento. Os iniciadores utilizados para a amplificação do controle SATR-1 foram: HIPO2 Universal-1 5' GTT ATA TTA TTT TTT GTT TTT TTG, HIPO2 Reverso-1 5' ACA TTT CCT TAT AAT ATT ATT CC, HIPO2 Universal-2 5' TAT AGT GGT GGT GTA TAT TTG e HIPO2 Reverso-2 5' CAC CTA ACC TAT AAT ATT TCT TC. As reações de *Nested* 1 e *Nested* 2 foram realizadas sob condições *touch up*, no qual são realizadas 3 ciclagens com temperaturas de anelamento aumentando 2°C em cada uma. Para *Nested* 1 as Tm utilizadas foram: 48°C no primeiro ciclo, 50°C nos 5 próximos ciclos e 52°C nos 35 ciclos finais. Para a *Nested* 2, as Tm utilizadas foram: 52°C no primeiro ciclo, 54°C nos próximos 5 ciclos e 56°C nos 35 ciclos finais.

3.4.3. PCR específico para Metilação (MSP) do gene *MMP2*

A técnica de MSP (*Methylation Specific PCR*) descrita em 1996 (Herman, Graff *et al.*, 1996) foi usada no estudo da metilação da ilha de CpG do gene *MMP2* em amostras de tumores primários de mama. Os iniciadores utilizados foram os mesmos descritos por Chernov e colaboradores (2009) (Tabela 3).

TABELA 3: INICIADORES PARA MSP

Iniciadores	Seqüência 5'-3'	CpGs	Amplicom (pb)
MMP2-MF	GCGGTTATACGTATCGAGTTAGC	23, 24, 25 e 26	205
MMP2-MR	ACTCTTTATCCGTTTTAAAAACGAC	49 e 50	
MMP2-UF	GGTGGTTATATGTATTGAGTTAGTGA	23, 24, 25 e 26	206
MMP2-UR	ACTCTTTATCCATTTTAAAAACAAC	49 e 50	

Nota: À esquerda na tabela temos uma coluna com os nomes dos iniciadores utilizados. MMP2-MF é o iniciador universal e MMP2-MR é o iniciador reverso, ambos para a condição metilada. MMP2-UF é o iniciador universal e MMP2-UR é o iniciador reverso, ambos para a condição não metilada. À sua direita está descrita a seqüência nucleotídica dos iniciadores e também os CpGs analisados pela técnica de MSP. O tamanho dos fragmentos para as reações metilada e não metilada é de 205 e 206 pb, respectivamente.

As reações de MSP descritas por Chernov e colaboradores (2009) não puderam ser reproduzidas por isso as reações tiveram que ser padronizadas ajustando-se as temperaturas e tempos de anelamento, bem como o número de ciclos. Todas as reações foram realizadas em um volume final de 20 µL contendo solução tampão 1X; MgCl₂ 1,5 mM; dNTP 200 µM; 8 pmoles de cada iniciador (universal e reverso); Taq Platinum (Invitrogen) 1u/µL e 0,5 a 1,0 µL de DNA tratado com bissulfito de sódio. As condições de amplificação para a reação U foram: 95°C por 5 minutos, desnaturação do DNA a 94°C por 20 segundos; 55°C por 14 segundos; e 72°C por 20 segundos em um total de 36 ciclos. Finalizando à 72°C por 5 minutos. As condições de amplificação para a reação M foram: 95°C por 5 minutos, desnaturação do DNA a 94°C por 20 segundos; 54°C por 15 segundos; e 72°C por 20 segundos em um total de 32 ciclos. Finalizando à 72°C por 5 minutos. Em todas as reações foram utilizados os DNAs das linhagens HB4a (controle positivo para reação U e negativo para reação M) e MCF7 (controle negativo para reação U e positivo para reação M). Os produtos das reações foram visualizados em eletroforese em gel de poliacrilamida 8% corado com nitrato de prata.

3.5. ANÁLISE DA EXPRESSÃO PROTÉICA DA MMP-2

3.5.1. *Tissue Micro Array* – TMA

O material tumoral empregado para análises de expressão da proteína MMP-2 encontra-se estocado nos laboratórios de patologia do HC e do HNSG sob a forma de blocos de parafina. Para utilização deste material, realizou-se a

técnica de TMA seguindo protocolo desenvolvido no Laboratório de Patologia Experimental - PUCPR (Schuler, Gurmini *et al.*, 2008). Neste método emprega-se um cilindro com diâmetro de 3 mm para puncionar a área representativa de cada tumor emblocado em parafina. Foram realizadas duas punções para cada tumor, a fim de garantir que a área tumoral fosse realmente capturada.

Cada amostra foi desparafinizada em um inclusor EG1160 (Leica®) à uma temperatura de 60°C. Em seguida foram dispostas em cassetes plásticos em posições pré-definidas, e sobre os tumores é derramada a parafina quente.

Foram produzidos três blocos de TMA para as 16 amostras de tumor primário de mama. Para cada um dos blocos foram realizadas várias secções de 4 µM utilizando de um micrótomo RM2145 (Leica®) e foram transferidos para lâminas adesivas catiõnicamente carregadas que servem para melhor contenção do material biológico. Para cada amostra de tumor foram retirados 2 cortes empregados respectivamente para coloração hematoxilina/eosina (HE) e para imunohistoquímica (IHQ).

3.5.2. Imunohistoquímica – IHQ

Foram realizadas reações de IHQ nas secções dos tumores provenientes dos blocos de TMA. As lâminas contendo os tumores foram desparafinizadas através de 2 lavagens em xilol por 10 minutos, 3 lavagens com etanol absoluto por 1 minuto e 1 vez com álcool etílico 80% por 1 minuto. O bloqueio da peroxidase endógena foi realizada com o Kit Advance (Dako®), que apresenta solução de peróxido de hidrogênio 5% em metanol. Após retirado o excesso dos reagentes, foi realizada a recuperação antigênica no Imuno Retrival (Dako®) em banho maria à 99°C por 40 minutos. Em seguida, as lâminas devem ser lavadas com água destilada para remover o excesso dos reagentes. O anticorpo primário contra MMP2 foi adicionado neste momento e em seguida as lâminas foram incubadas em câmara úmida na geladeira por toda a noite. O anticorpo primário utilizado foi o *anti-MMP2/72 kDa Collagenase IV Clone 5PM346* (Gentaur Molecular Products), obtido de camundongo. No dia seguinte, as lâminas foram lavadas e depois incubadas por 15 minutos com tampão TBS tris pH 7,3. Após retirar esse tampão e em entre cada nova etapa que vem a seguir, as lâminas foram lavadas com tampão TBS tris pH 7,3 e secadas com papel absorvente. Foi adicionado o

Advance link (Dako®) por 30 minutos. O próximo reagente foi o *Advance enzyme* (Dako®), por 30 minutos. E então o cromógeno DAB (3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride) foi adicionado e retirado quando foi visualizada a coloração castanha. Neste momento foi feita a lavagem com água destilada, para que não haja excesso de coloração ou geração de fundo castanho nos cortes. A contra-coloração foi realizada com Hematoxilina de Harris por 5 minutos. São realizadas as lavagens em água por 5 minutos, 3 vezes com etanol absoluto por 1 minuto e a diafanização com 3 lavagens com xilol por 5 minutos. Por último, foi adicionada a lamínula para proteção dos cortes.

A visualização das amostras foi realizada em microscópio óptico BX50 (Olympus®) acoplado com uma câmera (DinoLyfe®). O *software* utilizado para obtenção digital das imagens foi o Image pro Plus 4.5. Cada corte foi escaneado com objetiva de 400x de aumento. Contando com o auxílio da patologista Dra. Lúcia Noronha, foi realizada a avaliação subjetiva da intensidade da imunoreatividade, dentro de um escore numérico estipulado de 0 a +2, refletindo para as seguintes intensidades: 0, não reativo; +1, reatividade fraca; +2, reatividade forte.

3.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS

A análise de correlação entre os dados clínico-patológicos obtidos das amostras de tumores primários de mama e entre os resultados de metilação do gene *MMP2* e dos resultados de IHQ foram realizadas através do teste qui-quadrado (χ^2) e/ou teste exato de Fischer através do programa computacional *Prism 5 for Winsdows* (GraphPad Prism 5.0). Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$. Foi realizada também a análise univariada de Cox (1972), com intervalo de confiança de 95%, para determinar correlação entre as variáveis e sobrevida das paciente.

4. RESULTADOS

4.1. ANÁLISE *IN SÍLICO* DO GENE *MMP2*

Para a identificação de ilhas de CpG na região promotora do gene *MMP2*, utilizamos o programa CpG Plot (disponível em <http://www.ebi.ac.uk/Tools/emboss/cpgplot/index.html>) e depois o programa Methprimer (disponível em <http://www.urogene.org/methprimer/index1.html>) para analisar a sequência que englobava desde a região promotora até o início do primeiro éxon (foram avaliados 2 kb à jusante e à montante do início da transcrição do gene), compreendendo um tamanho de 3306 pb (Figura 11).

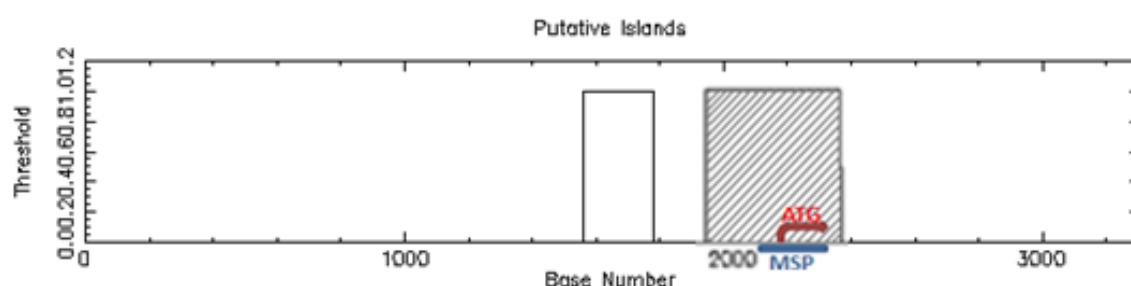


FIGURA 11. ILHAS DE CpG DO GENE *MMP2*. Gráfico representativo das ilhas de CpG presentes na região promotora dentro da região avaliada (2 kb a montante e 2 kb jusante da região 5' TSS do gene *MMP2*), sendo a ilha hachurada a avaliada neste estudo. A seta em vermelho representa o sítio de início de transcrição do gene; e a região em azul representa a localização da região analisada pela técnica de MSP.

Fonte: Adaptado de CpGPLOT.

O gráfico obtido pelo programa CpG Plot mostra duas regiões ricas em dinucleotídeos CG. Uma delas, a mais distante do ATG do início de transcrição, tem 241 pb e não foi incluída nesse estudo por ter tamanho muito abaixo ao estipulado (500 pb) por Gardiner e Fromer (1987), para possuir influência na expressão gênica. A região considerada nesse estudo foi a ilha de CpG que possui um tamanho de 423 pb (Figura 11) e 51 dinucleotídeos CG ao longo de sua sequência (Figura 12), e que inclui o início de transcrição. A ilha está localizada a -251 e + 144 do ATG inicial. Os oligonucleotídeos iniciadores empregados na reação de MSP foram aqueles preconizados por Chernov e colaboradores (2009). Os iniciadores nomeados universais englobam os dinucleotídeos CG presentes nas posições 23, 24, 25 e 26 da ilha de CpG estudada e os iniciadores reversos localizam-se nas posições 49 e 50 (Figura 12). A sequência mostrada foi obtida através do programa Methprimer que destaca o DNA antes e depois de tratamento com bissulfito de sódio.

4.2. ANÁLISE DA EXPRESSÃO DOS GENE *MMP2* POR RT-PCR EM LINHAGENS DE MAMA

Para avaliar a expressão do gene *MMP2* utilizamos a técnica de RT-PCR. O RNA total das linhagens tumorais foi extraído e avaliado qualitativamente por eletroforese em gel de agarose 1% (Figura 13).

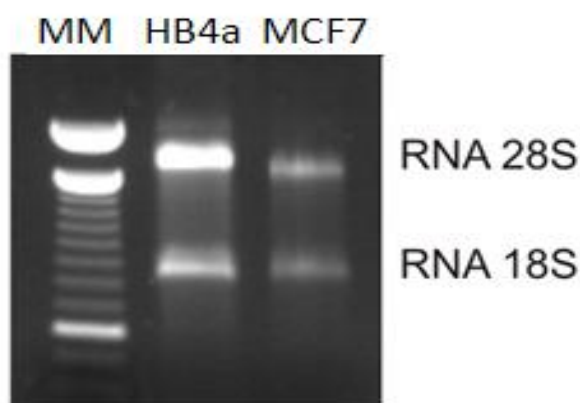


FIGURA 13. RNA TOTAL EXTRAÍDO DE LINHAGENS DE MAMA. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo 0,2 µg/ml. MM trata-se do marcador de massa molecular 100 bp *ladder*. Observam-se as bandas correspondentes aos RNAs ribossômicos 28S e 18S

A avaliação qualitativa feita através da observação do gel mostra as duas bandas de RNA 28S e 18S bem evidentes. As concentrações de RNA foram obtidas mediante a relação entre A260nm e A280nm (DO_{260}/DO_{280}) que fornece uma estimativa da pureza dos ácidos nucleicos. A partir deste dado foi calculado um volume que contivesse aproximadamente 500 ng de RNA para ser utilizado no próximo procedimento que foi a síntese de cDNA.

A eficiência de síntese dos cDNAs foi avaliada por PCR do gene constitutivo *GAPDH*. Os resultados foram avaliados por eletroforese em gel de poliacrilamida a 8% corado com nitrato de prata, e tanto a amostra de cDNA da linhagem HB4a, quanto da linhagem MCF7 mostraram o fragmento correspondente ao gene *GAPDH* de 296 pb (Figura 14A).

A partir deste resultado verificou-se que o cDNA sintetizado tinha boa qualidade uma vez que não havia banda correspondente à contaminação da reação com DNA genômico. As amostras de cDNA também estavam quantitativamente satisfatórias, porque as bandas do gene *GAPDH* estavam bem visíveis. Assim sendo, o cDNA pôde ser utilizado como molde em reações de RT-PCR para avaliar o perfil de expressão do gene *MMP2*, cujo fragmento

era de 194 pb. Foi observada a expressão do gene *MMP2* apenas na linhagem HB4a (Figura 14B), que é a linhagem celular normal de mama. O resultado negativo para expressão de *MMP-2* com a linhagem MCF7 já era esperado, uma vez que Chernov e colaboradores (2009) já haviam analisado e seqüenciado a região da ilha desse gene, mostrando que estava totalmente metilado.

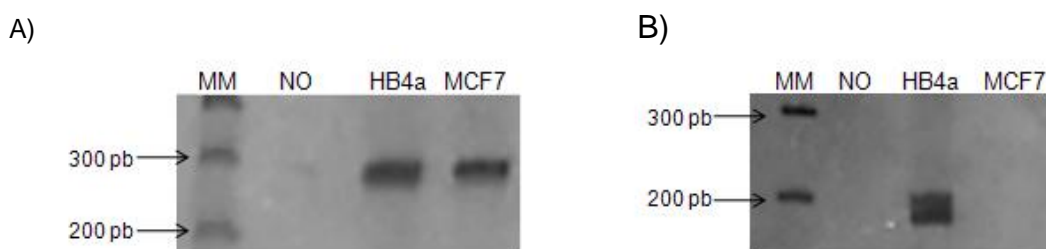


FIGURA 14: RT-PCR DO GENE DE EXPRESSÃO CONSTITUTIVA *GAPDH* E DO GENE *MMP2* EM LINHAGENS DE MAMA. MM é o marcador de massa molecular 100 bp *ladder* e NO corresponde ao branco da reação. A) análise da expressão do gene *GAPDH* com fragmento de 296 pb. B) Análise de expressão do gene *MMP2* com fragmento de 194 pb.

4.3. ANÁLISE DA METILAÇÃO EM AMOSTRAS DE TUMORES PRIMÁRIOS DE MAMA

O DNA das amostras de tumores primários de mama foi submetido a eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo (Figura 15). Com o resultado da eletroforese foi possível verificar que o DNA genômico se encontrava íntegro na maioria das amostras, apesar da presença do aspecto arrastado no gel, indicativo de degradação do material genômico.

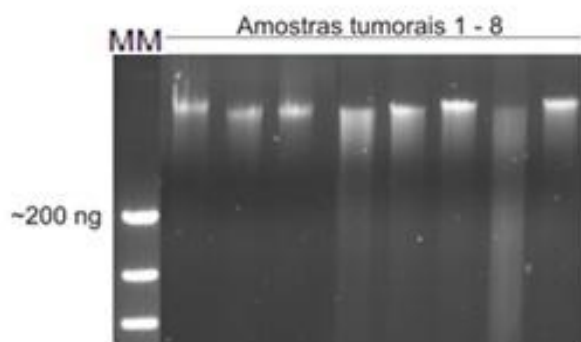


FIGURA 15. DNAs EXTRAÍDOS DE TUMORES PRIMÁRIOS DE MAMA. Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. MM equivale ao marcador de massa molecular, onde a banda superior equivale a ~200 ng.

Os DNAs obtidos das linhagens e dos tumores primários foram submetidos ao tratamento com bissulfito de sódio. A verificação da eficácia do tratamento com bissulfito de sódio das amostras foi realizado através do PCR que amplifica a sequência satélite SATR-1 (Figura 16).

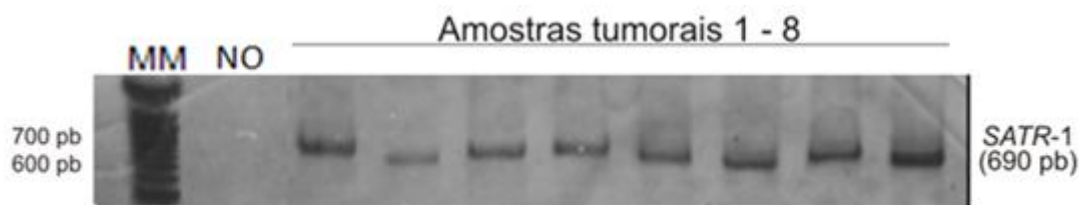


FIGURA 16. CONTROLE DA EFICIÊNCIA DO TRATAMENTO DE DNA COM BISSULFITO DE SÓDIO. Gel de poliacrilamida 8% corado com nitrato de prata. MM trata-se do marcador de massa molecular 100 bp *ladder*, e NO é equivalente ao branco da reação de PCR. As bandas correspondentes à sequência satélite do gene *SATR-1* têm tamanho de 690pb.

Após amplificação do fragmento de DNA correspondente à *SATR-1*, demonstrou-se que o tratamento com bissulfito de sódio foi eficiente. A próxima etapa foi a padronização da reação MSP nas linhagens celulares HB4a e MCF7, em ambas as condições, metilado (M) e não metilado (U). Como a linhagem HB4a expressava *MMP2*, esperava-se visualizar banda apenas para reação U e a linhagem tumoral MCF7 que não expressava, esperava-se banda apenas para reação M (Figura 17).

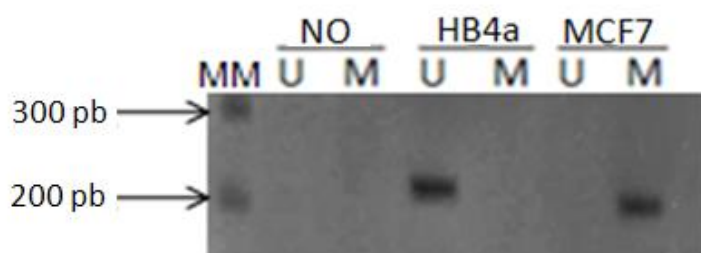
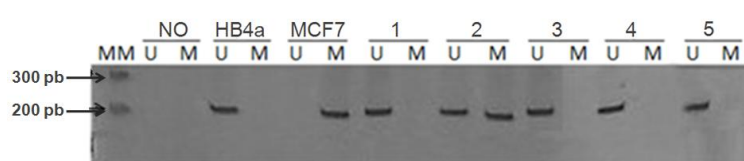


FIGURA 17: MSP DO GENE *MMP2* EM LINHAGENS CELULARES DE MAMA. Eletroforese em poliacrilamida 8% corado com nitrato de prata 10%. MM é o marcador de massa molecular 100 bp *ladder* e No corresponde ao branco da reação. A letra U corresponde à reação não metilada (*unmethylated*) com fragmento de 206 pb e M corresponde à reação metilada (*methylated*) com fragmento de 205 pb.

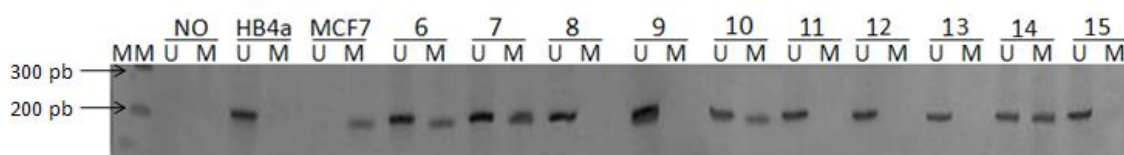
Com este resultado foi possível empregar as duas linhagens como controle de reação de MSP para o gene *MMP2*, uma vez que, HB4a foi usada como controle positivo para U e negativo para M; e MCF-7 apresentou apenas banda para M, sendo controle negativo para U e positivo para M.

Todas as amostras de tumores primários foram submetidas à reação de MSP empregando como controle as duas linhagens acima mencionadas. Foi observado que todas as amostras apresentavam o gene *MMP2* não metilado (Figura 18). Esse resultado já era esperado devido a presença de células normais no tumor. Além disso, foi possível verificar que 48% das amostras (12/25) estavam também metiladas para o gene *MMP2*. 20% das amostras de carcinoma ductal de grau I; 40% das amostras de carcinoma ductal de grau II; e 70% das amostras de carcinoma ductal de grau III encontravam-se metiladas.

A)



B)



C)

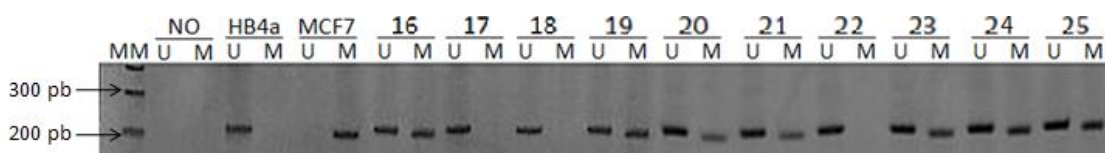


FIGURA 18: MSP DO GENE *MMP2* EM AMOSTRAS DE TUMORES PRIMÁRIOS DE MAMA. Eletroforese em poliacrilamida 8% corado com nitrato de prata 10%. MM é o marcador de massa molecular 100 bp *ladder*. A letra U corresponde à reação não metilada (*unmethylated*) com fragmento de 206 pb e M corresponde à reação metilada (*methylated*) com fragmento de 205 pb. Para as figuras A, B e C, a amostra NO corresponde ao branco da reação; HB4a ao controle positivo para U e negativo para M; e MCF7 ao controle negativo para U e positivo para M. A) Carcinomas ductais de grau I. B) Carcinomas ductais de grau II. C) Carcinomas ductais de grau III.

4.4. IMUNOHISTOQUÍMICA (IHQ) DA MMP-2

A imunohistoquímica foi realizada inicialmente em material placentário humano, que apresenta expressão de MMP-2. No controle negativo (Figura 19A) não há marcação de cor castanha, o que indica negatividade de reações cruzadas do anticorpo e ausência de fundo, pois o controle negativo recebe o mesmo tratamento que as demais amostras com exceção do anticorpo primário

anti-MMP2. No controle positivo da reação (Figura 19B) há marcação na cor castanha, indicando que o anticorpo anti-MMP2 estava funcionando e que qualquer negatividade nos resultados não seria em função de sua falha.

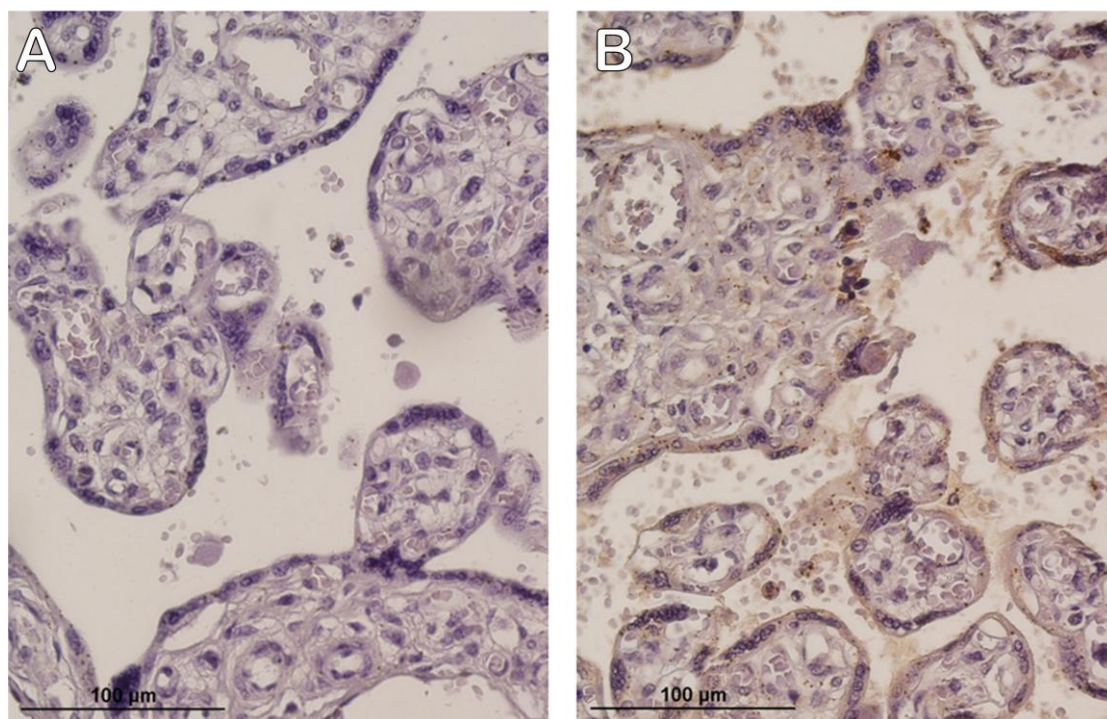


FIGURA 19: CONTROLES DE REATIVIDADE DO ANTICORPO. A) Controle negativo de IHQ. B) Controle positivo de IHQ, mostrando várias áreas de marcação em castanho. Microscopia óptica. Aumento de 400x.

As amostras de tumores primários de mama foram então submetidas à IHQ para testar a presença da MMP-2 nas mesmas. A avaliação subjetiva da intensidade da imunoreatividade dos casos de IHQ forneceu um escore que varia de 0 a +2 (Figura 20). Dos 18 tumores avaliados por IHQ, 22% eram de escore 0, 28% de escore +1 e 50% de escore +2.

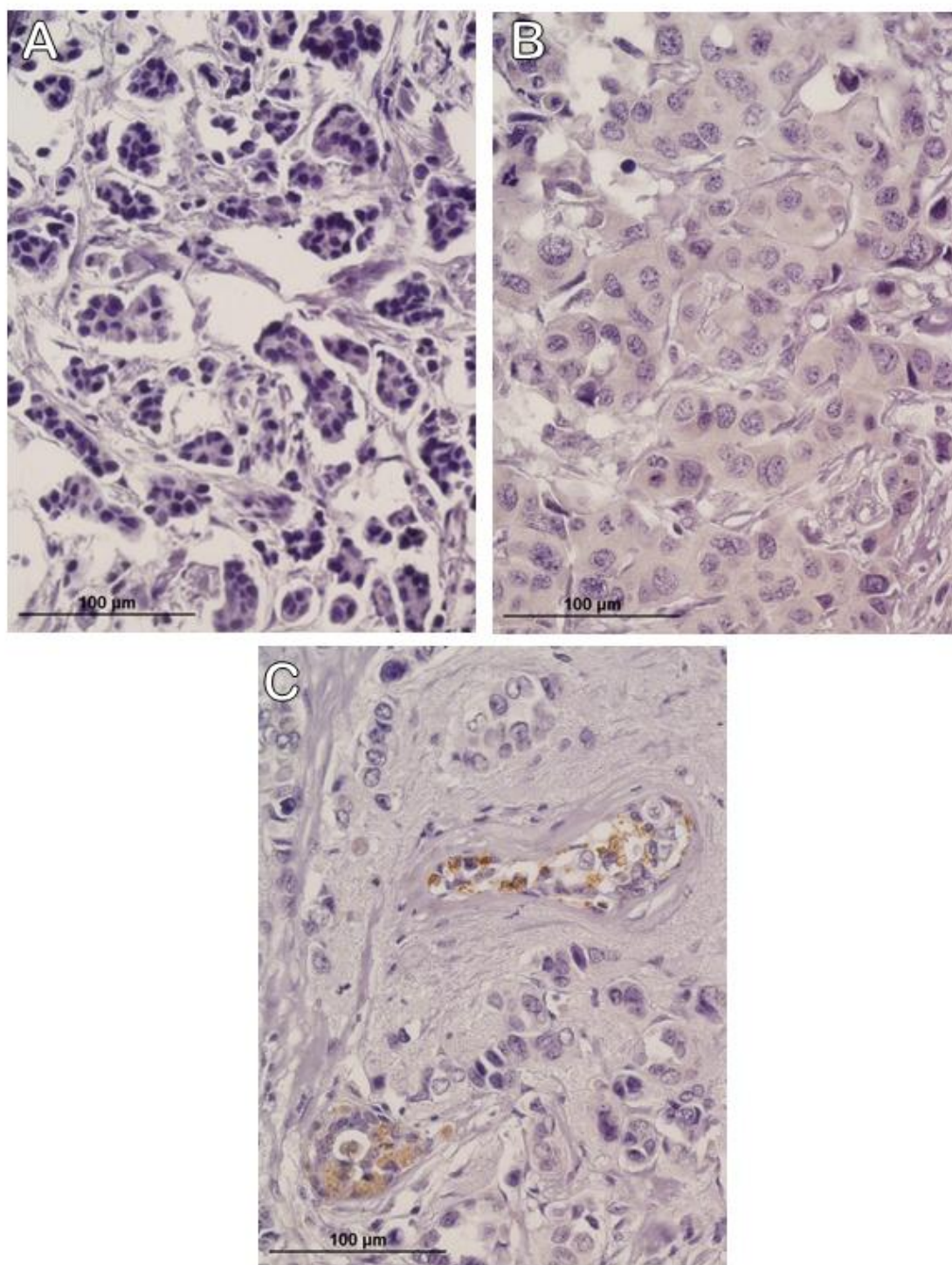


FIGURA 20: IMUNOHISTOQUÍMICA DE TUMORES PRIMÁRIOS DE MAMA. A) Amostra sem imunoreatividade para MMP-2, classificada no escore 0. B) Amostra positiva (fraca) para imunoreatividade de MMP-2, classificada no escore +1. C) Amostra positiva (forte) para imunoreatividade da MMP-2, classificada no escore +2. Microscopia óptica. Aumento de 400x

4.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS DE METILAÇÃO DA ILHA DE CpG DO GENE *MMP2* EM RELAÇÃO AOS DADOS DE EXPRESSÃO PROTÉICA E CLÍNICO-PATOLÓGICOS

Os resultados de MSP e IHQ obtidos para os tumores primários de mama foram correlacionados com os dados clínico-patológicos das pacientes estudadas (Tabela 4). Não foram observados resultados estatisticamente significativos ($p < 0,05$) nos parâmetros clínico-patológicos frente aos resultados de MSP (Tabela 5). Entretanto foi possível observar uma tendência estatística demonstrando uma associação entre o grau histológico e o perfil de metilação do gene *MMP2*. Existe uma tendência de que quanto maior o grau histológico maior é a possibilidade de metilação para este gene, sendo que das 10 amostras de Grau histológico III, 7 apresentaram metilação ($p=0,0541$) (Tabela 5).

Os resultados de metilação também foram analisados com relação a IHQ (Tabela 6) e não foi verificada significância estatística ($p=0,0915$). Além disso, foi realizada a análise dos dados de IHQ obtidos das amostras de tumores primários de mama frente aos parâmetros clínico-patológicos, sem nenhum resultado significativo.

Para relacionar a IHQ com a metilação do DNA realizamos um segundo tipo de agrupamento de amostras, considerando como negativas as amostras com resultado para IHQ de 0 e +1 e como positivas as amostras com resultado de IHQ de +2 (TABELA 7). Isto por que é possível que amostras com pouca expressão já estejam sofrendo metilação do promotor de *MMP2*, antes mesmo do seu completo silenciamento gênico. Com este tipo de análise também não foi encontrado significado estatístico ($p=0,3186$).

TABELA 4: REAÇÕES DE MSP, IHQ E DADOS CLÍNICO-PATOLÓGICOS DAS AMOSTRAS TUMORAIS DE MAMA

GI	CP	I	T	Ln	RE	% RE	MSP RE	MSP MMP2	IHQ MMP2	MMP-2	RP	HER2	E	Rc	Met	O
1	162	49	T1	-	+	P 25-30	-	-	nd	nd	+	nd	I	-	-	-
2	402	68	T2	+	+	P 30	-	M	2	+	+	-	IIB	-	-	-
3	515	63	T1	-	+	P10-30	-	-	2	+	+	-	I	-	-	-
4	591	42	nd	nd	nd	nd	nd	-	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
5	619	76	T1	-	+	P50-80	nd	-	1	+	+	-	I	nd	nd	nd
GII	CP	I	T	Ln	RE	% RE	MSP RE	MSP MMP2	IHQ MMP2	MMP-2	RP	HER2	E	Rc	Met	O
6	172	68	T2	+	+	P>30	M	M	nd	nd	+	-	IV	-	+	+
7	290	71	T1	nd	+	P10	nd	M	nd	nd	nd	-	nd	-	-	-
8	365	39	T2	+	+	P10-30	-	-	nd	nd	-	-	IIB	-	-	-
9	413	83	T2	+	+	P10-30	-	-	0	-	+	-	IIB	-	-	+
10	497	45	T1	+	+	P>30	M	M	2	+	+	-	IV	-	+	-
11	527	53	T2	+	-	N	-	-	0	-	-	+	IIIA	-	-	-
12	542	40	T2	+	+	P30	-	-	2	+	+	+	IIA	-	-	-
13	556	63	T2	-	+	P50	-	-	0	-	+	-	IIA	-	-	-
14	562	49	T2	+	+	P10-30	M	M	1	+	+	+	IIIA	-	-	-
15	620	44	T2	-	+	P10-30	nd	-	2	+	+	+	IIA	nd	nd	nd
GIII	CP	I	T	Ln	RE	% RE	MSP RE	MSP MMP2	IHQ MMP2	MMP-2	RP	HER2	E	Rc	Met	O
16	243	48	T4	+	+	X	M	-	2	+	+	-	IIIB	nd	+	+
17	399	82	T2	+	+	P10-30	M	M	1	+	+	-	IIB	-	-	-
18	422	75	T4	-	+	P>30	-	-	0	-	+	-	IV	+	+	-
19	525	45	T3	+	+	P10-30	M	M	2	+	+	+	IIIA	-	+	-
20	537	69	T2	-	-	N	M	M	1	+	-	-	IIB	+	-	+
21	595	60	T1	-	+	P30	nd	M	2	+	+	+	I	nd	nd	nd
22	597	50	T2	+	-	N	nd	-	1	+	+	+	IIB	nd	nd	nd
23	600	37	T1	+	+	P70	nd	M	nd	nd	+	+	IIIA	nd	nd	nd
24	603	58	T3	-	+	P30	nd	M	nd	nd	+	-	IIB	nd	nd	nd
25	604	40	T2	-	-	N	nd	M	2	+	+	-	IIA	nd	nd	nd

Nota: GI: grau histológico I; GII: grau histológico II, GIII: grau histológico III, CP: código da paciente; I: idade; T: tamanho; Ln: linfonodo; RE: receptor de estrogênio; MSP: methylation specific PCR; IHQ: imunohistoquímica, RP: receptor de progesterona; E: estadio; Rc: recidiva; Met: metástase; O: óbito; M: metilado; +: positivo; -: negativo; nd: dado não disponível.

TABELA 5: ANÁLISE DA ASSOCIAÇÃO ENTRE A METILAÇÃO DO GENE *MMP2* COM DADOS CLÍNICO-PATOLÓGICOS DOS TUMORES DE MAMA:

Variáveis	Amostras (%)	Metilação <i>MMP2</i>		<i>p</i>
		M (%)	U (%)	
IDADE (n=25)				
< 45 anos	6 (24)	2 (33,3)	4 (66,7)	0,6447
≥ 45 anos	19 (76)	10 (52,6)	9 (47,4)	
ESTADIO (n=24)				
I	4 (16,7)	1 (25)	3 (75)	0,3215
II	11 (45,8)	5 (45,5)	6 (54,5)	
III/IV	9 (37,5)	5 (55,6)	4 (44,4)	
TAMANHO (n=24)				
pT1	7 (29,2)	4 (57,1)	3 (42,9)	0,8959
pT2	13 (54,1)	6 (46,2)	7 (53,8)	
pT3/pT4	4 (16,7)	2 (50,0)	2 (50,0)	
SBR (n=25)				
I	5 (20%)	1 (20,0)	4 (80,0)	0,0541
II	10 (40%)	4 (40,0)	6 (60,0)	
III	10 (40%)	7 (70,0)	3 (30,0)	
LINFONODO (n=23)				
Positivo	13 (56,5)	7 (53,8)	6 (46,2)	0,6802
Negativo	10 (43,5)	4 (40,0)	6 (60,0)	
RE (n=24)				
Positivo	20 (83,3)	10 (50,0)	10 (50,0)	1,0000
Negativo	4 (16,7)	2 (50,0)	2 (50,0)	
RP (n=23)				
Postivo	20 (87,0)	10 (50,0)	10 (50,0)	1,0000
Negativo	3 (13,0)	1 (33,3)	2 (66,7)	
HER2 (n=23)				
Positivo	8 (34,8)	4 (50,0)	4 (50,0)	1,0000
Negativo	15 (65,2)	8 (53,3)	7 (46,6)	
METASTASE (n=18)				
Positivo	5 (27,8)	3 (60,0)	2 (40,0)	0,6078
Negativo	13 (72,2)	5 (38,5)	8 (61,5)	
RECIDIVA (n=16)				
Positivo	2 (12,5)	1 (50,0)	1 (50,0)	1,0000
Negativo	14 (87,5)	7 (50,0)	7 (50,0)	
ÓBITO (n=17)				
Positivo	4 (23,5)	2 (50,0)	2 (50,0)	1,0000
Negativo	13 (76,5)	6 (46,2)	7 (53,8)	

TABELA 6: ANÁLISE DA ASSOCIAÇÃO ENTRE A IMUNOHISTOQUÍMICA DA MMP-2 COM DADOS DE METILAÇÃO E CLÍNICO-PATOLÓGICOS DOS TUMORES DE MAMA

Variáveis	Amostras (%)	Expressão MMP-2 (IHQ)		p
		- (0)	+ (1 e 2)	
MSP MMP2 (n=18)				
U	10 (55,6)	4	6	0,0915
M	8 (44,4)	0	8	
IDADE (n=18)				
< 45 anos	3 (16,7)	0	3	0,5304
≥ 45 anos	15 (83,3)	4	11	
ESTADIO (n=18)				
I	3 (16,7)	0	3	0,5258
II	9 (50,0)	2	7	
III/IV	6 (33,3)	2	4	
TAMANHO (n=18)				
pT1	4 (22,2)	0	4	0,4678
pT2	11 (61,1)	3	8	
pT3/pT4	3 (16,7)	1	2	
SBR (n=18)				
I	3 (16,7)	0	3	0,2210
II	7 (38,9)	3	4	
III	8 (44,4)	1	7	
LINFONODO (n=18)				
Positivo	11 (61,1)	2	6	1,0000
Negativo	7 (38,9)	2	7	
RE (n=18)				
Positivo	14 (77,8)	3	11	0,9814
Negativo	4 (22,2)	1	3	
RP (n=18)				
Postivo	16 (88,9)	3	13	0,4052
Negativo	2 (11,1)	1	1	
HER2 (n=18)				
Positivo	7 (38,9)	1	6	1,0000
Negativo	11 (61,1)	3	9	
METASTASE (n=13)				
Positivo	4 (30,8)	1	3	1,0000
Negativo	9 (69,2)	3	6	
RECIDIVA (n=12)				
Positivo	2 (16,7)	1	1	1,0000
Negativo	10 (83,3)	3	7	
ÓBITO (n=13)				
Positivo	3	1	2	0,9860
Negativo	10	3	7	

TABELA 7: ANÁLISE DA ASSOCIAÇÃO ENTRE A METILAÇÃO E A IMUNOHISTOQUÍMICA DA MMP-2 COM DIFERENTE AGRUPAMENTO DE EXPRESSÃO

EXPRESSÃO				
Variáveis	Amostras (%)	Expressão MMP-2 (IHQ)		p
		- (0 e 1)	+ (2)	
MSP MMP2 (n=18)				
U	10 (55,6)	6 (60,0)	4 (40,0)	0,3186
M	8 (44,4)	3 (37,5)	5 (62,5)	

As amostras tumorais utilizadas nesse trabalho coincidem em sua maioria (17 de 25) com as amostras utilizadas por Ramos *et al.* (2010) em seu trabalho de mestrado, no qual foi analisado o efeito da metilação dos genes *CXCL12* e *ESR1* com diferentes dados clínico-patológicos. A fim de enriquecer os nossos resultados, buscamos os dados de Ramos e complementamos nossas análises estatísticas de diferentes modos, como descrito a seguir.

Os dados foram analisados quanto a associação entre IHQ da MMP-2 e os níveis de expressão protéica do receptor de estrógeno alfa (RE), distribuindo as amostras em dois grupos: (1) as que apresentam até 30% de células coradas para RE (≤ 30); e (2) as que apresentam mais de 30% de células coradas para RE (> 30) (Figura 21). Esta divisão foi feita de acordo com o mesmo critério utilizado por Ramos *et al.* (2010). Foi observado que 85% das amostras com RE ≤ 30 apresentam expressão da proteína MMP-2, e nas amostras com RE > 30 observa-se uma menor expressão de MMP-2. Este resultado foi analisado pelo teste de contingência RxC, apresentando aumento do risco de eventos (OR) de 2,75 em um intervalo de confiança (IC) correspondente: 0,16 - 46,79 ($p=0,2115$) (Figura 21).

Para completar, realizamos a análise estatística relacionando metilação do gene *ESR1* (receptor de estrógeno alfa) (Ramos, Camargo *et al.*, 2010) com os dados de imunohistoquímica da MMP-2. Verificamos que 100% das amostras metiladas para o gene *ESR1* apresentavam expressão de MMP-2, enquanto que apenas 43% das amostras não metiladas apresentavam expressão de MMP-2. Este resultado foi analisado pelo teste de contingência RxC, apresentando aumento do risco de eventos (OR) de 8,75 em um IC: 0,74 – 103,83 ($p=0,0730$) (Figura 22).

Além disso, entre as amostras metiladas para *ESR1* e positivas para MMP-2, houve em 67% das pacientes recidiva, metástase ou óbito em um

período de até 10 anos. Enquanto que para as amostras *ESR1* não metiladas também positivas para MMP-2, não houve nenhum caso de recidiva, metástase ou óbito.

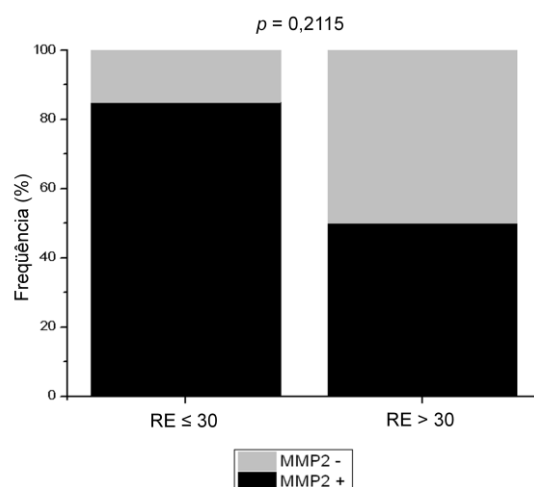


FIGURA 21: ANÁLISE ESTATÍSTICA ENTRE MMP-2 (IHQ) E RECEPTOR DE ESTRÓGENO ALFA. A coluna da esquerda mostra as amostras que apresentam expressão do RE ≤ 30 e a coluna da direita as amostras com expressão do RE > 30 . Em preto está destacada a porcentagem de amostras positivas para presença de MMP-2 e em cinza as amostras negativas para presença de MMP-2.

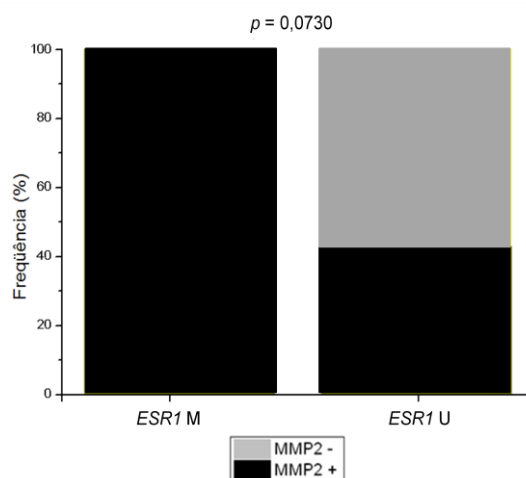


FIGURA 22: ANÁLISE ESTATÍSTICA ENTRE MMP-2 (IHQ) E METILAÇÃO DO GENE *ESR1*. A coluna da esquerda mostra as amostras que apresentam *ESR1* metilado e a coluna da direita as amostras com expressão do *ESR1* não metilado. Em preto está destacada a porcentagem de amostras positivas para presença de MMP-2 e em cinza as amostras negativas para presença de MMP-2. A associação entre essas duas variáveis (MMP-2 e RE) possui tendência significativa ($p = 0,0730$).

As amostras utilizadas nesse estudo vêm sendo coletadas desde 2000, sendo possível fazer análise de sobrevida global (SG), que é o tempo de vida da paciente após o diagnóstico do tumor primário, e a sobrevida livre de doença (SLD), que é o tempo da paciente sem nenhum sintoma clínico ou laboratorial de recorrência do tumor ou de metástases. Assim sendo, as

amostras foram avaliadas também sob esse aspecto. As análises de SG e SLG foram feitas segundo o modelo de COX (Cox, 1972) (Tabela 8).

TABELA 8: TABELA SOBREVIDA GLOBAL E LIVRE DE DOENÇA – COX

A) Sobrevida Global			
Variável	P	(HR) Exp(b)	95% CI of Exp(b)
MMP-2	0,5952	0,4715	0,0299 to 7,4419
Idade	0,2606	10,458	0,9677 to 1,1303
Estadio	0,2405	19,335	0,6466 to 5,7817
Tamanho	0,426	14,150	0,6046 to 3,3115
Grau	0,2343	25,828	0,5451 to 12,2377
Linfonodo	0,7286	14,934	0,1568 to 14,2229
RE	0,1087	0,1013	0,0063 to 1,6387
RP	0,799	0,7401	0,0738 to 7,4210
HER2	0,9666	0	0,0000 to 2,53E+234
ESR metilado	0,1148	62,675	0,6479 to 60,6329

B) Sobrevida Livre de Doença			
Variável	P	(HR) Exp(b)	95% CI of Exp(b)
MMP-2	0,9642	0,9455	0,0830 to 10,77
Idade	0,6884	0,9869	0,9257 to 1,0521
Estadio	0,0161	99,096	1,5439 to 63,6050
Tamanho	0,1542	17,465	0,8142 to 3,7463
Grau	0,1185	33,271	0,7411 to 14,9363
Linfonodo	0,5214	20,538	0,2301 to 18,3281
RE	0,9664	397,627,402	0,0000 to 24,8E+216
RP	0,9533	1,345,549,073	0,0000 to 113E+174
HER2	0,6797	16,590	0,1519 to 18,1171
ESR metilado	0,0479	91,803	1,0318 to 81,6813

Esta análise foi realizada primeiramente com as amostras em separado, o que se chama de análise univariada de COX. Para sobrevida global, nenhum fator isolado apresentou significado estatístico (Tabela 8A). Na análise de sobrevida livre de doença (Tabela 8B) foi somente observado valor significativo para a metilação do gene *ESR1* ($p=0,0479$) e entre estágio ($p=0,0161$). Para nenhuma dessas duas variáveis o HR encontra-se no intervalo de confiança e, portanto, tais resultados são imprecisos. Apesar da imprecisão dos valores de p obtidos, devido ao pequeno tamanho amostral (25 amostras), nossos resultados apresentados para o gene *ESR1* metilado como um dos componentes interferentes na sobrevida livre de doença são semelhantes aos resultados obtidos por Ramos e colaboradores (2010), que utilizaram um maior número de amostras.

5. DISCUSSÃO

A capacidade adquirida pela massa tumoral maligna de deslocamento do tumor primário e colonizar um novo ambiente exige estratégias que envolvem mudanças nas junções das células entre si e com seu microambiente (Hanahan e Weinberg, 2000). A metaloprotease-2 (MMP-2) é uma enzima que tem papel comprovado na destruição da membrana basal (Stamenkovic, 2000) e por isso tem sido um alvo de pesquisa para utilização como biomarcador. Muitos trabalhos têm descrito a sua presença em diversos materiais biológicos associados ao câncer (Tabela 3). Apesar dos vários trabalhos apontando a participação da MMP-2 em diferentes eventos no câncer, os mecanismos que levam ao aumento ou diminuição de sua expressão ainda não estão completamente desvendados. A epigenética tem recebido destaque na literatura por elucidar muitos mecanismos de genes que sofrem alteração de expressão em quase todos os tipos de câncer estudados. Recentemente a metilação do DNA foi demonstrada como um mecanismo de regulação do gene *MMP2* em uma linhagem tumoral de mama (Chernov *et al.*, 2009). Além disso, nosso grupo de pesquisa vem estudando alguns marcadores moleculares de câncer de mama, entre eles a quimiocina *CXCR4* (Grochoski, 2008), a quimiocina *CXCL12* e o gene do receptor de estrogênio *ESR1* (Ramos, Camargo *et al.*, 2010), o gene *ADAM33* (Seniski, Camargo *et al.*, 2009), entre outros. Nosso enfoque tem sido o de aprofundar os conhecimentos em marcadores de diagnóstico e prognóstico no câncer de mama. Devido à importância da enzima MMP-2 nos processos de metástases e, portanto, revelando-se um provável marcador molecular e também a nossa experiência em estudar genes regulados por metilação do DNA, nos propusemos a estudar mais detalhadamente a regulação da expressão de *MMP2* em câncer de mama.

Inicialmente procuramos identificar linhagens tumorais de mama que pudessem ser usadas como modelo de estudo do gene *MMP2*, em termos de expressão gênica. Para isso escolhemos as linhagens normal (HB4a) e tumoral (MCF7) de mama. A linhagem HB4a, expressa o gene *MMP2*, enquanto que na linhagem MCF7 este gene é silenciado (Figura 14B). Antes da publicação de Chernov e colaboradores (2009) nós havíamos não só detectado que este gene apresentava uma ilha de CpG (Figuras 11 e 12), mas também que ela

estaria envolvida na regulação da expressão do gene. Foram utilizadas amostras de cDNA de linhagens tratadas com agente desmetilante, que foi capaz de restaurar a expressão do gene *MMP2*. Entretanto, Chernov e colaboradores (2009) utilizando a linhagem MCF7 publicaram de modo inédito os dados que pretendíamos trabalhar mais detalhadamente. Apesar disso, demos continuidade modificando alguns dos objetivos. Foram utilizados alguns dos dados do trabalho de Chernov e colaboradores (2009), que foram adaptados para as nossas condições como descrito e discutido a seguir.

Foram utilizados os iniciadores de MSP (methylation specific PCR) descritos por Chernov e colaboradores (2009), porém foi necessária uma nova padronização, ou seja, a que está descrita no trabalho não mostrou resultados satisfatórios em nosso laboratório. A re-padronização foi feita utilizando a linhagem HB4a, que apresentou somente a banda respectiva à condição não metilada. Assim como foi utilizada a linhagem MCF7 para a situação oposta, a metilada (Figura 17). Com a padronização realizada, prosseguimos com o estudo do perfil de metilação do gene *MMP2* em tumores primários de mama (Figura 18). Como já era esperado, observamos uma frequência de 100% de tumores não metilados para o gene *MMP2*. Este resultado pode ser explicado pela heterogeneidade das células presentes em uma amostra tumoral, que sempre possui células normais, estromais e inflamatórias. Das 25 amostras tumorais analisadas, 12 estavam também metiladas (48%) para *MMP2*. Os dados de metilação foram utilizados para estudar a possível correlação desse evento epigenético com as variáveis clínico-patológicas. A análise estatística pelos testes exato de Fisher ou de χ^2 mostrou ausência de correlação da metilação do gene *MMP2* com qualquer variável, exceto para uma tendência entre metilação de *MMP2* e o SBR ($p=0,0541$) (Tabela 8). SBR é a variável que considera principalmente a diferenciação celular do tumor, variando de I a III, sendo classificadas em SBR III as amostras com maior perda da diferenciação celular, ou seja, com maior potencial de malignidade. Aparentemente, quanto maior o grau histológico, maior é o número de amostras metiladas para *MMP2*. Este resultado é bem conflitante, porque a metilação está relacionada com o silenciamento gênico e, no caso da *MMP2*, não era de se esperar sua ausência ou diminuição de expressão em um grau histológico mais avançado ou mais característico de malignidade. Entretanto não é incomum encontrar genes

silenciados que supostamente estimulariam um tumor ao seu complexo processo de malignidade. Um exemplo disso é o gene *CXCL12* que aparentemente em fases iniciais de crescimento do tumor de mama, apresenta-se expresso e estimulando as células com seu receptor CXCR4 à proliferação celular (Hall e Korach, 2003). Entretanto, em estágios mais avançados o gene *CXCL12* é silenciado por metilação e esse processo parece ser primordial para que as células tumorais se destaquem da massa primaria em direção aos pulmões, ossos ou fígado (Muller, Homey *et al.*, 2001; Ramos, Camargo *et al.*, 2010). Portanto, devido à grande complexidade no entendimento do papel das metaloproteases no câncer, em especial da MMP-2, mais estudos seriam necessários para compreender se a hipótese de silenciamento de *MMP2* em graus histológicos avançados fariam parte do mecanismo desse gene no câncer. Porém, como discutiremos a seguir os resultados de metilação obtidos neste trabalho podem não ser condizentes com o real silenciamento do gene *MMP2*.

O melhor parâmetro para verificar se dados de metilação obtidos por PCR podem ser condizentes com o real silenciamento do gene é a observação da presença ou ausência da proteína alvo de regulação. Portanto, para confirmar os resultados de silenciamento parcial ou total obtidos por MSP, realizamos análise imunohistoquímica (IHQ) da enzima MMP-2 em 18 dos tumores (que foram os únicos disponíveis). A IHQ demonstra a presença da enzima nas células tumorais, porém não sua atividade. Nossos resultados de IHQ, quando analisados quanto a metilação, mostraram que oito amostras mesmo metiladas apresentaram expressão de MMP-2 e que quatro amostras não metiladas e que deveriam expressar a proteína não apresentaram expressão de MMP-2. Estes dados também não tiveram significativo estatístico ($p=0,0915$) (Tabela 6). Estes resultados são no mínimo opostos a qualquer expectativa de correlação. Apesar disso, a presença de metilação pode não representar silenciamento completo de um gene. Por isso fizemos um reagrupamento das amostras considerando as amostras com pouca expressão de MMP2 (+1) como negativas, contudo esses resultados também não foram estatisticamente significativos ($p=0,3186$) (Tabela 7).

Assim sendo, presumimos que os iniciadores utilizados na técnica de MSP não são confiáveis para uso em amostras tumorais, uma vez que a região

analisada talvez não apresente diferença importante no perfil de metilação entre os dinucleotídeos CpG.

A escolha da região onde são desenhados os iniciadores de MSP é imprescindível para o funcionamento adequado da técnica. Os iniciadores devem conter dinucleotídeos CpG ditos “diferencialmente metilados”, ou seja, que apresentam diferenças de metilação entre linhagens celulares que expressam e não expressam o gene de interesse. Isso indicaria que esses CpGs estariam de fato participando da regulação epigenética da transcrição. Tais dinucleotídeos deveriam estar desmetilados em linhagens que expressam o gene e metilados em linhagens que não expressam. Uma hipótese que explicaria o problema observado em nossos resultados estaria no planejamento dos iniciadores realizado por Chernov e colaboradores (2009). Uma provável explicação foi o fato do grupo americano ter utilizado apenas uma linhagem de mama como condição metilada e linhagens de glioblastoma para a condição não metilada na padronização da técnica de MSP. A utilização de um número maior de linhagens tumorais de mama poderia minimizar este erro, fornecendo uma visão ampliada do perfil de metilação do gene em questão.

Concluídas as avaliações de metilação, avaliamos os resultados de IHQ, verificando que 78% das amostras tumorais apresentavam a presença da proteína MMP2. Apesar disso a análise IHQ diante das variáveis clínico-patológicas não mostrou resultados estatisticamente significativos (Tabela 6). Esse resultado poderia ser relacionado ao baixo número amostral. Entretanto, Talvensaaari-Mattila e colaboradores (2003) analisaram 453 tumores primários de mama e mostraram coincidentemente o mesmo resultado: 78% das amostras apresentavam a proteína MMP-2. Estatisticamente, também não encontram resultados estatisticamente significativos diretos com qualquer variável clínico-patológica. Assim sendo, nosso pequeno número de amostras pode não ser o fator determinante para a ausência de correlação. Por outro lado, o grupo de Talvensaaari-Mattila relacionou a enzima MMP-2 como fator de pior prognóstico em sub-grupos de pacientes com carcinoma de mama que apresentam receptor de estrógeno alfa negativo. E mais importante, demonstraram que a ausência de MMP2 é significativamente ligada a um prognóstico favorável em pacientes receptor de estrógeno negativo. Outra correlação clínico-patológica importante foi a observação de que elevados

níveis de MMP-2 em tumores de mama apresentam associação com a amplificação de HER2, que é estabelecido como um marcador de uma doença mais agressiva (Talvensaari-Mattila 2003).

Dados anteriores do nosso grupo de pesquisa mostraram que nas amostras em que há diminuição do receptor de estrógeno alfa, há o concomitante desligamento do gene *ESR1* por hipermetilação de sua região promotora (Ramos, Camargo *et al.*, 2010). Isto poderia indicar que as amostras com baixa expressão de RE podem tornar-se com o tempo RE-negativas e, portanto, não responsivas a terapia hormonal. Tendo em vista esse dados e também os resultados de Talvensaari-Mattila (2003), fizemos uma análise utilizando os dados de expressão das proteínas RE e MMP-2 (levando em consideração que algumas amostras do trabalho de Ramos foram utilizadas nesse trabalho). Para tanto, dividimos as amostras em dois tipos: (1) amostras com baixo número de células expressando RE (de 0 a 30%); e (2) as com maior número de células expressando RE (mais que 30%). Observamos que 85% das amostras com baixa expressão de RE apresentavam expressão de MMP-2, enquanto que 50% das amostras com alta expressão de RE não apresentavam expressão de MMP-2. Segundo o ensaio estatístico realizado (teste RxC), esse resultado indicaria que as pacientes com RE ≤ 30 que apresentam expressão de MMP-2 têm um risco 2,75 vezes maior de apresentarem RE diminuído, o que pode estar relacionado a um mau prognóstico. Esta análise parece indicar que a presença de MMP-2 em conjunto com a ausência de RE pode ter algum significado no processo tumoral. Entretanto, este resultado é impreciso, pois além de um intervalo de confiança muito extenso (IC: 0,16 – 46,79) não apresenta significado estatístico ($p=0,2115$) (Figura 21). Com os dados de metilação do gene *ESR1* obtidos por Ramos *et al.* (2010), observamos também que 100% das amostras metiladas para este gene apresentam expressão de MMP-2. Em contrapartida, das amostras não metiladas para *ESR1*, apenas 43% têm expressão de MMP-2. De acordo com teste ODDS esse resultado indicaria que as pacientes com o gene do receptor de estrógeno alfa (*ESR1*) metilado que apresentam expressão de MMP-2 têm um risco 8,75 vezes maior de apresentarem um mau prognóstico. O intervalo de confiança para tal análise também é muito extenso (IC: 0,74 – 103,83), entretanto parece apresentar uma tendência significativa

($p=0,0730$). Além disso, observamos que entre as amostras metiladas para *ESR1* e positivas para MMP-2, houve em 67% das pacientes com recidiva ou metástase ou óbito num prazo de até 10 anos. Enquanto que para as amostras *ESR1* não metiladas também positivas para MMP-2 não houve nenhum caso de recidiva, metástase ou óbito. A explicação mais plausível para a falta de significância nos nossos resultados é, que além do número amostral avaliado neste trabalho ser muito baixo, houve ainda sua estratificação que foi necessária para avaliar os subgrupos distintos de pacientes.

Resumindo, os dados de Talvensaari-Mattila (2003), apontaram que a presença de MMP-2 em amostras RE negativas seria um fator de mau prognóstico. Além disso, os dados de Ramos (2010) mostraram que a metilação do *ESR1* estão correlacionados com um pior prognóstico podendo ter relação direta com o aparecimento de metástases e posterior óbito das pacientes. Apesar de não conseguirmos provar estatisticamente nossos resultados, podemos supor que as pacientes que apresentam uma diminuição na expressão de RE, devido ao esse silenciamento por hipermetilação do gene *ESR1*, e que concomitantemente expressam MMP-2 no momento do diagnóstico da doença, já apresentam um péssimo prognóstico.

Quanto à metilação do gene *MMP2* há ainda outras considerações a serem analisadas. Quando se observa que a presença da MMP-2 é favorável ao surgimento de metástases e, portanto, ao desenvolvimento do tumor, conseqüentemente é esperado que haja metilação do gene *MMP2* em amostras normais e hipometilação nas amostras tumorais, especialmente as que já apresentam metástases. Apesar disso, a existência de enzimas com capacidade de desmetilar o DNA permanece elusiva. Entretanto, o que se tem visto, é que no câncer em geral a metilação aparentemente ocorre à medida que o tumor progride para a malignidade. A partir desta constatação diversas dúvidas surgem tentando explicar essa aparente discrepância. Uma das hipóteses que levantamos é que a epigenética não interferisse na regulação da expressão da MMP-2 em tumores de mama. Isto parece ser improvável visto que há metilação do promotor do gene *MMP2*, o que leva a crer que a metilação esteja fazendo parte de algum mecanismo ainda não totalmente esclarecido.

Alguns trabalhos mostram que são as células estromais circundantes que produzem MMP-2 no processo tumoral (Benaud, Dickson *et al.*, 1998; Roy, Yang *et al.*, 2009). Isso gera a segunda hipótese no qual a metilação de *MMP2* nas células tumorais participaria de alguma via de sinalização. Ou seja, talvez seja necessário que ocorra a metilação deste gene para que as células estromais em volta do tumor sejam estimuladas a super produção desta enzima. Isto ainda não explica a falta de correlação nos nossos resultados entre a metilação (MSP) e a presença da enzima (IHQ), uma vez que o anticorpo utilizado para IHQ apresenta marcação citoplasmática. Isto significa que são as próprias células tumorais que estão produzindo a enzima, reforçando mais uma vez nossa hipótese de que os iniciadores para MSP planejados por Chernov e colaboradores (2009) não são válidos para estudo da metilação de *MMP2* em tumores de mama.

Sabe-se cada vez mais da importância dos mecanismos epigenéticos na progressão do câncer. Encontrar um biomarcador para a caracterização das metástases tem se tornado o foco das pesquisas atualmente. E se esse marcador existir em nível de DNA, ele é capaz de predizer ainda mais cedo o comportamento da doença. Isso é fundamental para um tratamento mais eficaz e conseqüente diminuição do número de óbitos.

Neste trabalho, consideramos que a MMP-2 apresenta grande possibilidade de ser um fator prognóstico dependente, ou seja, sua expressão em tumores de mama associada com a ausência total ou parcial do receptor de estrógeno correlaciona-se com um aumento na probabilidade de aparecimento de metástases e óbito nas pacientes. A continuidade deste estudo é, portanto, de fundamental importância para desvendar alguns desses mecanismos e talvez encontrar efetivamente mais um marcador epigenético para metástases no câncer de mama. Os próximos passos propostos seriam o seqüenciamento de diversas linhagens tumorais de mama para encontrar regiões diferencialmente metiladas e o desenho de iniciadores para MSP englobando os dinucleotídeos CpG presentes nessas regiões. Também seria importante trabalhar com maior número de tumores nas análises de MSP e IHQ para podermos avaliar se de fato as suposições levantadas neste trabalho têm relevância estatística.

6. CONCLUSÃO

Com os dados obtidos neste trabalho, podemos chegar às seguintes conclusões:

1. É possível utilizar as linhagens de mama HB4a e MCF7 como controles de metilação do gene *MMP2*.
2. A metilação do promotor do gene *MMP2* utilizando os dados de Chernov e colaboradores (2009) não apresentou correlação com os dados clínico-patológicos de pacientes com tumores de mama.
3. Os dados de hipermetilação do gene *MMP2* e de imunohistoquímica não apresentaram correlação. Assim sendo, podemos sugerir que os iniciadores utilizados nesse trabalho não são adequados para essa abordagem.
4. A proteína MMP-2 está presente na maioria das amostras de tumores de mama, mostrando sua ubíqua expressão nas diversas etapas da progressão tumoral. Quando associada à diminuição de proteína RE ou à metilação do gene *ERS1*, pode-se inferir uma tendência de pior prognóstico para as pacientes.

7. REFERÊNCIAS

Adley, B. P., K. J. Gleason, *et al.* Expression of membrane type 1 matrix metalloproteinase (MMP-14) in epithelial ovarian cancer: high level expression in clear cell carcinoma. Gynecol Oncol, v.112, n.2, Feb, p.319-24. 2009.

Amalinei, C., I. D. Caruntu, *et al.* Biology of metalloproteinases. Rom J Morphol Embryol, v.48, n.4, p.323-34. 2007.

Antequera, F. Structure, function and evolution of CpG island promoters. Cell Mol Life Sci, v.60, n.8, Aug, p.1647-58. 2003.

Aznavoorian, S., M. L. Stracke, *et al.* Signal transduction for chemotaxis and haptotaxis by matrix molecules in tumor cells. J Cell Biol, v.110, n.4, Apr, p.1427-38. 1990.

Baker, E. A. e D. J. Leaper. The plasminogen activator and matrix metalloproteinase systems in colorectal cancer: relationship to tumour pathology. Eur J Cancer, v.39, n.7, May, p.981-8. 2003.

Bannister, A. J., P. Zegerman, *et al.* Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain. Nature, v.410, n.6824, Mar 1, p.120-4. 2001.

Banyai, L. e L. Patthy. Evidence for the involvement of type II domains in collagen binding by 72 kDa type IV procollagenase. FEBS Lett, v.282, n.1, Apr 22, p.23-5. 1991.

Barrett, J. C., M. Oshimura, *et al.* Role of oncogenes and tumor suppressor genes in a multistep model of carcinogenesis. Symp Fundam Cancer Res, v.39, p.45-56. 1986.

Barros, A. C. S. D., E. M. Barbosa, *et al.* Diagnóstico e tratamento do câncer de mama. Projeto Diretrizes - Associação Médica Brasileira e Conselho Federal de Medicina 2001.

Barski, A., S. Cuddapah, *et al.* High-resolution profiling of histone methylations in the human genome. Cell, v.129, n.4, May 18, p.823-37. 2007.

Benaud, C., R. B. Dickson, *et al.* Roles of the matrix metalloproteinases in mammary gland development and cancer. Breast Cancer Res Treat, v.50, n.2, Jul, p.97-116. 1998.

Bernstein, B. E., A. Meissner, *et al.* The mammalian epigenome. Cell, v.128, n.4, Feb 23, p.669-81. 2007.

Bertucci, F., D. Birnbaum, *et al.* Proteomics of breast cancer: principles and potential clinical applications. Mol Cell Proteomics, v.5, n.10, Oct, p.1772-86. 2006.

- Bestor, T. H. The DNA methyltransferases of mammals. Hum Mol Genet, v.9, n.16, Oct, p.2395-402. 2000.
- Bilimoria, M. M. e M. Morrow. The woman at increased risk for breast cancer: evaluation and management strategies. CA Cancer J Clin, v.45, n.5, Sep-Oct, p.263-78. 1995.
- Bird, A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. Genes Dev, v.16, n.1, Jan 1, p.6-21. 2002.
- Bjorklund, M. e E. Koivunen. Gelatinase-mediated migration and invasion of cancer cells. Biochim Biophys Acta, v.1755, n.1, May 25, p.37-69. 2005.
- Bjornland, K., K. Flatmark, *et al.* Matrix metalloproteinases participate in osteosarcoma invasion. J Surg Res, v.127, n.2, Aug, p.151-6. 2005.
- Bode, W., F. X. Gomis-Ruth, *et al.* Astacins, serralysins, snake venom and matrix metalloproteinases exhibit identical zinc-binding environments (HEXXHXXGXXH and Met-turn) and topologies and should be grouped into a common family, the 'metzincins'. FEBS Lett, v.331, n.1-2, Sep 27, p.134-40. 1993.
- Brooks, P. C., S. Stromblad, *et al.* Localization of matrix metalloproteinase MMP-2 to the surface of invasive cells by interaction with integrin alpha v beta 3. Cell, v.85, n.5, May 31, p.683-93. 1996.
- Bryan, T. M. e T. R. Cech. Telomerase and the maintenance of chromosome ends. Curr Opin Cell Biol, v.11, n.3, Jun, p.318-24. 1999.
- Carter, P., L. Presta, *et al.* Humanization of an anti-p185HER2 antibody for human cancer therapy. Proc Natl Acad Sci U S A, v.89, n.10, May 15, p.4285-9. 1992.
- Caudroy, S., M. Polette, *et al.* EMMPRIN-mediated MMP regulation in tumor and endothelial cells. Clin Exp Metastasis, v.19, n.8, p.697-702. 2002.
- Chernov, A. V., N. E. Sounni, *et al.* Epigenetic control of the invasion-promoting MT1-MMP/MMP-2/TIMP-2 axis in cancer cells. J Biol Chem, v.284, n.19, May 8, p.12727-34. 2009.
- Cheung, H. H., T. L. Lee, *et al.* DNA methylation of cancer genome. Birth Defects Res C Embryo Today, v.87, n.4, Dec, p.335-50. 2009.
- Cho, Y. B., W. Y. Lee, *et al.* Matrix metalloproteinase-9 activity is associated with poor prognosis in T3-T4 node-negative colorectal cancer. Hum Pathol, v.38, n.11, Nov, p.1603-10. 2007.
- Choe, G., J. K. Park, *et al.* Active matrix metalloproteinase 9 expression is associated with primary glioblastoma subtype. Clin Cancer Res, v.8, n.9, Sep, p.2894-901. 2002.

Chomczynski, P. e N. Sacchi. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal Biochem, v.162, n.1, Apr, p.156-9. 1987.

Cianfrocca, M. e L. J. Goldstein. Prognostic and predictive factors in early-stage breast cancer. Oncologist, v.9, n.6, p.606-16. 2004.

Collier, I. E., P. A. Krasnov, *et al.* Alanine scanning mutagenesis and functional analysis of the fibronectin-like collagen-binding domain from human 92-kDa type IV collagenase. J Biol Chem, v.267, n.10, Apr 5, p.6776-81. 1992.

Costa, F. F. Non-coding RNAs, epigenetics and complexity. Gene, v.410, n.1, Feb 29, p.9-17. 2008.

Costa, F. F., V. A. Paixao, *et al.* SATR-1 hypomethylation is a common and early event in breast cancer. Cancer Genet Cytogenet, v.165, n.2, Mar, p.135-43. 2006.

Coussens, L. M. e Z. Werb. Matrix metalloproteinases and the development of cancer. Chem Biol, v.3, n.11, Nov, p.895-904. 1996.

Couturier, J., A. Vincent-Salomon, *et al.* [Diagnosis of HER2 gene amplification in breast carcinoma]. Pathol Biol (Paris), v.56, n.6, Sep, p.375-9. 2008.

Cox, R. Value of objective examinations. Nature, v.237, n.5357, Jun 30, p.489-92. 1972.

Davidson, B., I. Goldberg, *et al.* Expression of metalloproteinases and their inhibitors in adenocarcinoma of the uterine cervix. Int J Gynecol Pathol, v.17, n.4, Oct, p.295-301. 1998.

De Smet, C. e A. Lorient. DNA hypomethylation in cancer: Epigenetic scars of a neoplastic journey. Epigenetics, v.5, n.3, Apr 10. 2010.

Deryugina, E. I., B. Ratnikov, *et al.* MT1-MMP initiates activation of pro-MMP-2 and integrin α v β 3 promotes maturation of MMP-2 in breast carcinoma cells. Exp Cell Res, v.263, n.2, Feb 15, p.209-23. 2001.

Du, T. e P. D. Zamore. microPrimer: the biogenesis and function of microRNA. Development, v.132, n.21, Nov, p.4645-52. 2005.

Dworkin, A. M., T. H. Huang, *et al.* Epigenetic alterations in the breast: Implications for breast cancer detection, prognosis and treatment. Semin Cancer Biol, v.19, n.3, Jun, p.165-71. 2009.

Egeblad, M. e Z. Werb. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. Nat Rev Cancer, v.2, n.3, Mar, p.161-74. 2002.

- Eissa, S., M. Swellam, *et al.* Diagnostic value of urinary molecular markers in bladder cancer. Anticancer Res, v.23, n.5b, Sep-Oct, p.4347-55. 2003.
- Elenbaas, B. e R. A. Weinberg. Heterotypic signaling between epithelial tumor cells and fibroblasts in carcinoma formation. Exp Cell Res, v.264, n.1, Mar 10, p.169-84. 2001.
- Esteve, P. O., H. G. Chin, *et al.* Human maintenance DNA (cytosine-5)-methyltransferase and p53 modulate expression of p53-repressed promoters. Proc Natl Acad Sci U S A, v.102, n.4, Jan 25, p.1000-5. 2005.
- Fabian, C. Tamoxifen or raloxifene in postmenopausal women for prevention of breast cancer: a tale of two choices--counterpoint. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, v.16, n.11, Nov, p.2210-2. 2007.
- Fanjul-Fernandez, M., A. R. Folgueras, *et al.* Matrix metalloproteinases: evolution, gene regulation and functional analysis in mouse models. Biochim Biophys Acta, v.1803, n.1, Jan, p.3-19. 2009.
- Feinberg, A. P. e B. Tycko. The history of cancer epigenetics. Nat Rev Cancer, v.4, n.2, Feb, p.143-53. 2004.
- Feinberg, A. P. e B. Vogelstein. Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. Nature, v.301, n.5895, Jan 6, p.89-92. 1983.
- Fernandez, C. A., L. Yan, *et al.* The matrix metalloproteinase-9/neutrophil gelatinase-associated lipocalin complex plays a role in breast tumor growth and is present in the urine of breast cancer patients. Clin Cancer Res, v.11, n.15, Aug 1, p.5390-5. 2005.
- Fire, A., S. Xu, *et al.* Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. Nature, v.391, n.6669, Feb 19, p.806-11. 1998.
- Fitzgibbons, P. L., D. L. Page, *et al.* Prognostic factors in breast cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. Arch Pathol Lab Med, v.124, n.7, Jul, p.966-78. 2000.
- Fridman, R., T. R. Fuerst, *et al.* Domain structure of human 72-kDa gelatinase/type IV collagenase. Characterization of proteolytic activity and identification of the tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2) binding regions. J Biol Chem, v.267, n.22, Aug 5, p.15398-405. 1992.
- Friedberg, M. H., M. J. Glantz, *et al.* Specific matrix metalloproteinase profiles in the cerebrospinal fluid correlated with the presence of malignant astrocytomas, brain metastases, and carcinomatous meningitis. Cancer, v.82, n.5, Mar 1, p.923-30. 1998.

Fujiwara, A., E. Shibata, *et al.* Evaluation of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) activity with film in situ zymography for improved cytological diagnosis of breast tumors. Breast Cancer, v.13, n.3, p.272-8. 2006.

Galis, Z. S. e J. J. Khatri. Matrix metalloproteinases in vascular remodeling and atherogenesis: the good, the bad, and the ugly. Circ Res, v.90, n.3, Feb 22, p.251-62. 2002.

Gardiner-Garden, M. e M. Frommer. CpG islands in vertebrate genomes. J Mol Biol, v.196, n.2, Jul 20, p.261-82. 1987.

Gerhards, S., K. Jung, *et al.* Excretion of matrix metalloproteinases 2 and 9 in urine is associated with a high stage and grade of bladder carcinoma. Urology, v.57, n.4, Apr, p.675-9. 2001.

Giannelli, G., J. Falk-Marzillier, *et al.* Induction of cell migration by matrix metalloprotease-2 cleavage of laminin-5. Science, v.277, n.5323, Jul 11, p.225-8. 1997.

Goldberg, G. I., S. M. Wilhelm, *et al.* Human fibroblast collagenase. Complete primary structure and homology to an oncogene transformation-induced rat protein. J Biol Chem, v.261, n.14, May 15, p.6600-5. 1986.

Gomez, D. E., D. F. Alonso, *et al.* Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. Eur J Cell Biol, v.74, n.2, Oct, p.111-22. 1997.

Gonzalez-Avila, G., C. Iturria, *et al.* 72-kD (MMP-2) and 92-kD (MMP-9) type IV collagenase production and activity in different histologic types of lung cancer cells. Pathobiology, v.66, n.1, p.5-16. 1998.

Greger, V., E. Passarge, *et al.* Epigenetic changes may contribute to the formation and spontaneous regression of retinoblastoma. Hum Genet, v.83, n.2, Sep, p.155-8. 1989.

Grochoski, M. Estudo da regulação epigenética por metilação do receptor de quimiocinas CXCR4 no câncer de mama. UFPR, Curitiba, 2008.

Gronbaek, K., C. Hother, *et al.* Epigenetic changes in cancer. APMIS, v.115, n.10, Oct, p.1039-59. 2007.

Gross, J. e C. M. Lapiere. Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay. Proc Natl Acad Sci U S A, v.48, Jun 15, p.1014-22. 1962.

Haberland, M., R. L. Montgomery, *et al.* The many roles of histone deacetylases in development and physiology: implications for disease and therapy. Nat Rev Genet, v.10, n.1, Jan, p.32-42. 2009.

Hall, J. M. e K. S. Korach. Stromal cell-derived factor 1, a novel target of estrogen receptor action, mediates the mitogenic effects of estradiol in ovarian and breast cancer cells. Mol Endocrinol, v.17, n.5, May, p.792-803. 2003.

Hanahan, D. e R. A. Weinberg. The hallmarks of cancer. Cell, v.100, n.1, Jan 7, p.57-70. 2000.

Harris, C. C. p53 tumor suppressor gene: from the basic research laboratory to the clinic--an abridged historical perspective. Carcinogenesis, v.17, n.6, Jun, p.1187-98. 1996.

Hashimoto, K., Y. Kihira, *et al.* Expression of matrix metalloproteinase-7 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in human prostate. J Urol, v.160, n.5, Nov, p.1872-6. 1998.

Hendrich, B. e S. Tweedie. The methyl-CpG binding domain and the evolving role of DNA methylation in animals. Trends Genet, v.19, n.5, May, p.269-77. 2003.

Henry, N. L. e D. F. Hayes. Uses and abuses of tumor markers in the diagnosis, monitoring, and treatment of primary and metastatic breast cancer. Oncologist, v.11, n.6, Jun, p.541-52. 2006.

Herman, J. G., J. R. Graff, *et al.* Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. Proc Natl Acad Sci U S A, v.93, n.18, Sep 3, p.9821-6. 1996.

Hilska, M., P. J. Roberts, *et al.* Prognostic significance of matrix metalloproteinases-1, -2, -7 and -13 and tissue inhibitors of metalloproteinases-1, -2, -3 and -4 in colorectal cancer. Int J Cancer, v.121, n.4, Aug 15, p.714-23. 2007.

Hiratsuka, S., K. Nakamura, *et al.* MMP9 induction by vascular endothelial growth factor receptor-1 is involved in lung-specific metastasis. Cancer Cell, v.2, n.4, Oct, p.289-300. 2002.

Holloway, C. M., A. Easson, *et al.* Technology as a force for improved diagnosis and treatment of breast disease. Can J Surg, v.53, n.4, Aug, p.268-77. 2010.

Hopp, T. A., H. L. Weiss, *et al.* Breast cancer patients with progesterone receptor PR-A-rich tumors have poorer disease-free survival rates. Clin Cancer Res, v.10, n.8, Apr 15, p.2751-60. 2004.

Hu, J., P. E. Van Den Steen, *et al.* Matrix metalloproteinase inhibitors as therapy for inflammatory and vascular diseases. Nat Rev Drug Discov, v.6, n.6, Jun, p.480-98. 2007.

Hua, J. e R. J. Muschel. Inhibition of matrix metalloproteinase 9 expression by a ribozyme blocks metastasis in a rat sarcoma model system. Cancer Res, v.56, n.22, Nov 15, p.5279-84. 1996.

Huhtala, P., L. T. Chow, *et al.* Structure of the human type IV collagenase gene. J Biol Chem, v.265, n.19, Jul 5, p.11077-82. 1990.

Ikeda, K. e S. Inoue. Estrogen receptors and their downstream targets in cancer. Arch Histol Cytol, v.67, n.5, Dec, p.435-42. 2004.

INCA. Estimativas 2010: Incidência de câncer no brasil. Instituto Nacional do Câncer. M. D. S. D. B. D. E. [Http://Www.Inca.Gov.Br](http://www.inca.gov.br). Rio de Janeiro 2009.

Itoh, T., M. Tanioka, *et al.* Experimental metastasis is suppressed in MMP-9-deficient mice. Clin Exp Metastasis, v.17, n.2, Mar, p.177-81. 1999.

_____. Reduced angiogenesis and tumor progression in gelatinase A-deficient mice. Cancer Res, v.58, n.5, Mar 1, p.1048-51. 1998.

Jaalinoja, J., R. Herva, *et al.* Matrix metalloproteinase 2 (MMP-2) immunoreactive protein is associated with poor grade and survival in brain neoplasms. J Neurooncol, v.46, n.1, p.81-90. 2000.

Jenuwein, T. e C. D. Allis. Translating the histone code. Science, v.293, n.5532, Aug 10, p.1074-80. 2001.

Joyce, J. A. e J. W. Pollard. Microenvironmental regulation of metastasis. Nat Rev Cancer, v.9, n.4, Apr, p.239-52. 2009.

Jumper, C., E. Cobos, *et al.* Determination of the serum matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 (TIMP-1) in patients with either advanced small-cell lung cancer or non-small-cell lung cancer prior to treatment. Respir Med, v.98, n.2, Feb, p.173-7. 2004.

Kajita, M., Y. Itoh, *et al.* Membrane-type 1 matrix metalloproteinase cleaves CD44 and promotes cell migration. J Cell Biol, v.153, n.5, May 28, p.893-904. 2001.

Kalluri, R. Basement membranes: structure, assembly and role in tumour angiogenesis. Nat Rev Cancer, v.3, n.6, Jun, p.422-33. 2003.

Kalluri, R. e R. A. Weinberg. The basics of epithelial-mesenchymal transition. J Clin Invest, v.119, n.6, Jun, p.1420-8. 2009.

Kalluri, R. e M. Zeisberg. Fibroblasts in cancer. Nat Rev Cancer, v.6, n.5, May, p.392-401. 2006.

Kamat, A. A., M. Fletcher, *et al.* The clinical relevance of stromal matrix metalloproteinase expression in ovarian cancer. Clin Cancer Res, v.12, n.6, Mar 15, p.1707-14. 2006.

Kaspar, M., L. Zardi, *et al.* Fibronectin as target for tumor therapy. Int J Cancer, v.118, n.6, Mar 15, p.1331-9. 2006.

Keller, K. E., M. Aga, *et al.* Extracellular matrix turnover and outflow resistance. Exp Eye Res, v.88, n.4, Apr, p.676-82. 2009.

Knauper, V., H. Will, *et al.* Cellular mechanisms for human procollagenase-3 (MMP-13) activation. Evidence that MT1-MMP (MMP-14) and gelatinase a (MMP-2) are able to generate active enzyme. J Biol Chem, v.271, n.29, Jul 19, p.17124-31. 1996.

Koc, M., D. Ediger, *et al.* Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) elevated in serum but not in bronchial lavage fluid in patients with lung cancer. Tumori, v.92, n.2, Mar-Apr, p.149-54. 2006.

Kopans, D. B. Breast Imaging. Phyladelphia, PA: Lippincott Willians & Wilkins. 2007

Koshikawa, N., G. Giannelli, *et al.* Role of cell surface metalloprotease MT1-MMP in epithelial cell migration over laminin-5. J Cell Biol, v.148, n.3, Feb 7, p.615-24. 2000.

Kouzarides, T. Chromatin modifications and their function. Cell, v.128, n.4, Feb 23, p.693-705. 2007.

Kuhlmann, K. F., J. W. Van Till, *et al.* Evaluation of matrix metalloproteinase 7 in plasma and pancreatic juice as a biomarker for pancreatic cancer. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, v.16, n.5, May, p.886-91. 2007.

La Rocca, G., I. Pucci-Minafra, *et al.* Zymographic detection and clinical correlations of MMP-2 and MMP-9 in breast cancer sera. Br J Cancer, v.90, n.7, Apr 5, p.1414-21. 2004.

Lafleur, M. A., A. M. Tester, *et al.* Selective involvement of TIMP-2 in the second activational cleavage of pro-MMP-2: refinement of the pro-MMP-2 activation mechanism. FEBS Lett, v.553, n.3, Oct 23, p.457-63. 2003.

Lander, E. S., L. M. Linton, *et al.* Initial sequencing and analysis of the human genome. Nature, v.409, n.6822, Feb 15, p.860-921. 2001.

Langenskiold, M., L. Holmdahl, *et al.* Increased plasma MMP-2 protein expression in lymph node-positive patients with colorectal cancer. Int J Colorectal Dis, v.20, n.3, May, p.245-52. 2005.

Lee, J. S., E. Smith, *et al.* The language of histone crosstalk. Cell, v.142, n.5, Sep 3, p.682-5. 2010.

Leeman, M. F., J. A. Mckay, *et al.* Matrix metalloproteinase 13 activity is associated with poor prognosis in colorectal cancer. J Clin Pathol, v.55, n.10, Oct, p.758-62. 2002.

Lengyel, E., B. Schmalfeldt, *et al.* Expression of latent matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) predicts survival in advanced ovarian cancer. Gynecol Oncol, v.82, n.2, Aug, p.291-8. 2001.

Liang, Q., H. Xiong, *et al.* Inhibition of basigin expression in glioblastoma cell line via antisense RNA reduces tumor cell invasion and angiogenesis. Cancer Biol Ther, v.4, n.7, Jul, p.759-62. 2005.

Liotta, L. A., U. P. Thorgeirsson, *et al.* Role of collagenases in tumor cell invasion. Cancer Metastasis Rev, v.1, n.4, p.277-88. 1982.

Liu, D., J. Nakano, *et al.* Overexpression of matrix metalloproteinase-7 (MMP-7) correlates with tumor proliferation, and a poor prognosis in non-small cell lung cancer. Lung Cancer, v.58, n.3, Dec, p.384-91. 2007.

Liu, Y. E., M. Wang, *et al.* Preparation and characterization of recombinant tissue inhibitor of metalloproteinase 4 (TIMP-4). J Biol Chem, v.272, n.33, Aug 15, p.20479-83. 1997.

Liu, Z. J., X. B. Zhang, *et al.* Progesterone receptor gene inactivation and CpG island hypermethylation in human leukemia cancer cells. FEBS Lett, v.567, n.2-3, Jun 4, p.327-32. 2004.

Lochter, A. e M. J. Bissell. An odyssey from breast to bone: multi-step control of mammary metastases and osteolysis by matrix metalloproteinases. APMIS, v.107, n.1, Jan, p.128-36. 1999.

Lopez-Otin, C. e L. M. Matrisian. Emerging roles of proteases in tumour suppression. Nat Rev Cancer, v.7, n.10, Oct, p.800-8. 2007.

Luger, K., A. W. Mader, *et al.* Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. Nature, v.389, n.6648, Sep 18, p.251-60. 1997.

Martin, J., J. Knowlden, *et al.* Identification and independent regulation of human mesangial cell metalloproteinases. Kidney Int, v.46, n.3, Sep, p.877-85. 1994.

Mattick, J. S. e I. V. Makunin. Non-coding RNA. Hum Mol Genet, v.15 Spec No 1, Apr 15, p.R17-29. 2006.

Maurel, J., C. Nadal, *et al.* Serum matrix metalloproteinase 7 levels identifies poor prognosis advanced colorectal cancer patients. Int J Cancer, v.121, n.5, Sep 1, p.1066-71. 2007.

Mayer, W., A. Niveleau, *et al.* Demethylation of the zygotic paternal genome. Nature, v.403, n.6769, Feb 3, p.501-2. 2000.

Millis, R. R. Correlation of hormone receptors with pathological features in human breast cancer. Cancer, v.46, n.12 Suppl, Dec 15, p.2869-71. 1980.

Miyake, H., M. Muramaki, *et al.* Expression of potential molecular markers in prostate cancer: correlation with clinicopathological outcomes in patients undergoing radical prostatectomy. Urol Oncol, v.28, n.2, Mar-Apr, p.145-51.

Momparler, R. L. Cancer epigenetics. Oncogene, v.22, n.42, Sep 29, p.6479-83. 2003.

Morgia, G., M. Falsaperla, *et al.* Matrix metalloproteinases as diagnostic (MMP-13) and prognostic (MMP-2, MMP-9) markers of prostate cancer. Urol Res, v.33, n.1, Feb, p.44-50. 2005.

Muller, A., B. Homey, *et al.* Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. Nature, v.410, n.6824, Mar 1, p.50-6. 2001.

Murphy, G. e H. Nagase. Progress in matrix metalloproteinase research. Mol Aspects Med, v.29, n.5, Oct, p.290-308. 2008.

Murphy, G., J. P. Segain, *et al.* The 28-kDa N-terminal domain of mouse stromelysin-3 has the general properties of a weak metalloproteinase. J Biol Chem, v.268, n.21, Jul 25, p.15435-41. 1993.

Murphy, G., F. Willenbrock, *et al.* The C-terminal domain of 72 kDa gelatinase A is not required for catalysis, but is essential for membrane activation and modulates interactions with tissue inhibitors of metalloproteinases. Biochem J, v.283 (Pt 3), May 1, p.637-41. 1992.

Murray, G. I., M. E. Duncan, *et al.* Matrix metalloproteinase-1 is associated with poor prognosis in oesophageal cancer. J Pathol, v.185, n.3, Jul, p.256-61. 1998.

Nagase, H. e J. F. Woessner, Jr. Matrix metalloproteinases. J Biol Chem, v.274, n.31, Jul 30, p.21491-4. 1999.

Nakahara, H., L. Howard, *et al.* Transmembrane/cytoplasmic domain-mediated membrane type 1-matrix metalloprotease docking to invadopodia is required for cell invasion. Proc Natl Acad Sci U S A, v.94, n.15, Jul 22, p.7959-64. 1997.

Nielsen, T. O., F. D. Hsu, *et al.* Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. Clin Cancer Res, v.10, n.16, Aug 15, p.5367-74. 2004.

Noe, V., B. Fingleton, *et al.* Release of an invasion promoter E-cadherin fragment by matrilysin and stromelysin-1. J Cell Sci, v.114, n.Pt 1, Jan, p.111-118. 2001.

Noel, A., M. Jost, *et al.* Matrix metalloproteinases at cancer tumor-host interface. Semin Cell Dev Biol, v.19, n.1, Feb, p.52-60. 2008.

Ohtani, H. Stromal reaction in cancer tissue: pathophysiologic significance of the expression of matrix-degrading enzymes in relation to matrix turnover and immune/inflammatory reactions. Pathol Int, v.48, n.1, Jan, p.1-9. 1998.

Ohuchi, E., K. Imai, *et al.* Membrane type 1 matrix metalloproteinase digests interstitial collagens and other extracellular matrix macromolecules. J Biol Chem, v.272, n.4, Jan 24, p.2446-51. 1997.

Ongenaert, M., L. Van Neste, *et al.* PubMeth: a cancer methylation database combining text-mining and expert annotation. Nucleic Acids Res, v.36, n.Database issue, Jan, p.D842-6. 2008.

Page-Mccaw, A., A. J. Ewald, *et al.* Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. Nat Rev Mol Cell Biol, v.8, n.3, Mar, p.221-33. 2007.

Paguirigan, A., D. J. Beebe, *et al.* Mammary stem and progenitor cells: tumour precursors? Eur J Cancer, v.42, n.9, Jun, p.1225-36. 2006.

Papathoma, A. S., C. Petraki, *et al.* Prognostic significance of matrix metalloproteinases 2 and 9 in bladder cancer. Anticancer Res, v.20, n.3B, May-Jun, p.2009-13. 2000.

Park, M. T. e S. J. Lee. Cell cycle and cancer. J Biochem Mol Biol, v.36, n.1, Jan 31, p.60-5. 2003.

Parks, W. C., C. L. Wilson, *et al.* Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity. Nat Rev Immunol, v.4, n.8, Aug, p.617-29. 2004.

Paredes, J., N. Lopes, *et al.* P-cadherin and cytokeratin 5: useful adjunct markers to distinguish basal-like ductal carcinomas in situ. Virchows Arch, v.450, n.1, Jan, p.73-80. 2007.

Patra, S. K., A. Patra, *et al.* Histone deacetylase and DNA methyltransferase in human prostate cancer. Biochem Biophys Res Commun, v.287, n.3, Sep 28, p.705-13. 2001.

Perigny, M., I. Bairati, *et al.* Role of immunohistochemical overexpression of matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-11 in the prognosis of death by ovarian cancer. Am J Clin Pathol, v.129, n.2, Feb, p.226-31. 2008.

Perou, C. M., T. Sorlie, *et al.* Molecular portraits of human breast tumours. Nature, v.406, n.6797, Aug 17, p.747-52. 2000.

Plate, K. H., G. Breier, *et al.* Molecular mechanisms of developmental and tumor angiogenesis. Brain Pathol, v.4, n.3, Jul, p.207-18. 1994.

- Polette, M., N. Gilbert, *et al.* Gelatinase A expression and localization in human breast cancers. An in situ hybridization study and immunohistochemical detection using confocal microscopy. Virchows Arch, v.424, n.6, p.641-5. 1994.
- Polyak, K. Breast cancer: origins and evolution. J Clin Invest, v.117, n.11, Nov, p.3155-63. 2007.
- Polyak, K. e R. A. Weinberg. Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits. Nat Rev Cancer, v.9, n.4, Apr, p.265-73. 2009.
- Poola, I., R. L. Dewitty, *et al.* Identification of MMP-1 as a putative breast cancer predictive marker by global gene expression analysis. Nat Med, v.11, n.5, May, p.481-3. 2005.
- Puente, X. S., L. M. Sanchez, *et al.* Human and mouse proteases: a comparative genomic approach. Nat Rev Genet, v.4, n.7, Jul, p.544-58. 2003.
- Radice, D. e A. Redaelli. Breast cancer management: quality-of-life and cost considerations. Pharmacoeconomics, v.21, n.6, p.383-96. 2003.
- Ramos, E. A., A. A. Camargo, *et al.* Simultaneous CXCL12 and ESR1 CpG island hypermethylation correlates with poor prognosis in sporadic breast cancer. BMC Cancer, v.10, p.23. 2010.
- Ranuncolo, S. M., E. Armanasco, *et al.* Plasma MMP-9 (92 kDa-MMP) activity is useful in the follow-up and in the assessment of prognosis in breast cancer patients. Int J Cancer, v.106, n.5, Sep 20, p.745-51. 2003.
- Rao, J. S., M. Yamamoto, *et al.* Expression and localization of 92 kDa type IV collagenase/gelatinase B (MMP-9) in human gliomas. Clin Exp Metastasis, v.14, n.1, Jan, p.12-8. 1996.
- Rea, S., F. Eisenhaber, *et al.* Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases. Nature, v.406, n.6796, Aug 10, p.593-9. 2000.
- Reik, W. Stability and flexibility of epigenetic gene regulation in mammalian development. Nature, v.447, n.7143, May 24, p.425-32. 2007.
- Ringrose, L. e R. Paro. Polycomb/Trithorax response elements and epigenetic memory of cell identity. Development, v.134, n.2, Jan, p.223-32. 2007.
- Roberts, L. M., J. A. Visser, *et al.* Involvement of a matrix metalloproteinase in MIS-induced cell death during urogenital development. Development, v.129, n.6, Mar, p.1487-96. 2002.
- Robertson, K. D. DNA methylation and human disease. Nat Rev Genet, v.6, n.8, Aug, p.597-610. 2005.

Robertson, K. D. e P. A. Jones. DNA methylation: past, present and future directions. Carcinogenesis, v.21, n.3, Mar, p.461-7. 2000.

Ronnov-Jessen, L., O. W. Petersen, *et al.* Cellular changes involved in conversion of normal to malignant breast: importance of the stromal reaction. Physiol Rev, v.76, n.1, Jan, p.69-125. 1996.

Rowe, R. G. e S. J. Weiss. Breaching the basement membrane: who, when and how? Trends Cell Biol, v.18, n.11, Nov, p.560-74. 2008.

Roy, R., G. Louis, *et al.* Tumor-specific urinary matrix metalloproteinase fingerprinting: identification of high molecular weight urinary matrix metalloproteinase species. Clin Cancer Res, v.14, n.20, Oct 15, p.6610-7. 2008.

Roy, R., J. Yang, *et al.* Matrix metalloproteinases as novel biomarkers and potential therapeutic targets in human cancer. J Clin Oncol, v.27, n.31, Nov 1, p.5287-97. 2009.

Sambrook, J. e D. W. Russel. **Molecular cloning: A laboratory manual** New York: Cold Spring Harbor Laboratory. 2001

Sanguinetti, C. J., E. Dias Neto, *et al.* Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. Biotechniques, v.17, n.5, Nov, p.914-21. 1994.

Sappino, A. P., O. Skalli, *et al.* Smooth-muscle differentiation in stromal cells of malignant and non-malignant breast tissues. Int J Cancer, v.41, n.5, May 15, p.707-12. 1988.

Sauter, W., A. Rosenberger, *et al.* Matrix metalloproteinase 1 (MMP1) is associated with early-onset lung cancer. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, v.17, n.5, May, p.1127-35. 2008.

Sawaya, R. E., M. Yamamoto, *et al.* Expression and localization of 72 kDa type IV collagenase (MMP-2) in human malignant gliomas in vivo. Clin Exp Metastasis, v.14, n.1, Jan, p.35-42. 1996.

Schuler, S. L., J. Gurmini, *et al.* Hepatic and thymic alterations in newborn offspring of malnourished rat dams. JPEN J Parenter Enteral Nutr, v.32, n.2, Mar-Apr, p.184-9. 2008.

Seniski, G. G., A. A. Camargo, *et al.* ADAM33 gene silencing by promoter hypermethylation as a molecular marker in breast invasive lobular carcinoma. BMC Cancer, v.9, p.80. 2009.

Shapiro, S. D. Matrix metalloproteinase degradation of extracellular matrix: biological consequences. Curr Opin Cell Biol, v.10, n.5, Oct, p.602-8. 1998.

Shay, J. W. e S. Bacchetti. A survey of telomerase activity in human cancer. Eur J Cancer, v.33, n.5, Apr, p.787-91. 1997.

Shi, Y. Histone lysine demethylases: emerging roles in development, physiology and disease. Nat Rev Genet, v.8, n.11, Nov, p.829-33. 2007.

Shi, Y. B., Q. Li, *et al.* Regulation of apoptosis during development: input from the extracellular matrix (review). Int J Mol Med, v.2, n.3, Sep, p.273-82. 1998.

Shukeir, N., P. Pakneshan, *et al.* Alteration of the methylation status of tumor-promoting genes decreases prostate cancer cell invasiveness and tumorigenesis in vitro and in vivo. Cancer Res, v.66, n.18, Sep 15, p.9202-10. 2006.

Sier, C. F., G. Casetta, *et al.* Enhanced urinary gelatinase activities (matrix metalloproteinases 2 and 9) are associated with early-stage bladder carcinoma: a comparison with clinically used tumor markers. Clin Cancer Res, v.6, n.6, Jun, p.2333-40. 2000.

Smith, E. R., D. Zurakowski, *et al.* Urinary biomarkers predict brain tumor presence and response to therapy. Clin Cancer Res, v.14, n.8, Apr 15, p.2378-86. 2008.

Sorlie, T., C. M. Perou, *et al.* Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. Proc Natl Acad Sci U S A, v.98, n.19, Sep 11, p.10869-74. 2001.

Sporn, M. B. The war on cancer. Lancet, v.347, n.9012, May 18, p.1377-81. 1996.

Stamenkovic, I. Matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis. Semin Cancer Biol, v.10, n.6, Dec, p.415-33. 2000.

Stamps, A. C., S. C. Davies, *et al.* Analysis of proviral integration in human mammary epithelial cell lines immortalized by retroviral infection with a temperature-sensitive SV40 T-antigen construct. Int J Cancer, v.57, n.6, Jun 15, p.865-74. 1994.

Sternlicht, M. D., A. Lochter, *et al.* The stromal proteinase MMP3/stromelysin-1 promotes mammary carcinogenesis. Cell, v.98, n.2, Jul 23, p.137-46. 1999.

Sternlicht, M. D. e Z. Werb. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. Annu Rev Cell Dev Biol, v.17, p.463-516. 2001.

Stocker, W., F. Grams, *et al.* The metzincins--topological and sequential relations between the astacins, adamalysins, serralysins, and matrixins (collagenases) define a superfamily of zinc-peptidases. Protein Sci, v.4, n.5, May, p.823-40. 1995.

Streuli, C. Extracellular matrix remodelling and cellular differentiation. Curr Opin Cell Biol, v.11, n.5, Oct, p.634-40. 1999.

Su, L., W. Zhou, *et al.* Matrix metalloproteinase-1 promoter polymorphism and lung cancer risk. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, v.14, n.3, Mar, p.567-70. 2005.

Tavassoli, F. A. Lobular neoplasia: evolution of its significance and morphologic spectrum. Int J Surg Pathol, v.18, n.3 Suppl, Jun, p.174S-177S. 2010.

Tian, M., Y. Z. Cui, *et al.* Proteomic analysis identifies MMP-9, DJ-1 and A1BG as overexpressed proteins in pancreatic juice from pancreatic ductal adenocarcinoma patients. BMC Cancer, v.8, p.241. 2008.

Tomasek, J. J., G. Gabbiani, *et al.* Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. Nat Rev Mol Cell Biol, v.3, n.5, May, p.349-63. 2002.

Trudel, D., Y. Fradet, *et al.* Membrane-type-1 matrix metalloproteinase, matrix metalloproteinase 2, and tissue inhibitor of matrix proteinase 2 in prostate cancer: identification of patients with poor prognosis by immunohistochemistry. Hum Pathol, v.39, n.5, May, p.731-9. 2008.

Tsunezuka, Y., H. Kinoh, *et al.* Expression of membrane-type matrix metalloproteinase 1 (MT1-MMP) in tumor cells enhances pulmonary metastasis in an experimental metastasis assay. Cancer Res, v.56, n.24, Dec 15, p.5678-83. 1996.

Tutton, M. G., M. L. George, *et al.* Use of plasma MMP-2 and MMP-9 levels as a surrogate for tumour expression in colorectal cancer patients. Int J Cancer, v.107, n.4, Nov 20, p.541-50. 2003.

Van 'T Veer, L. J., H. Dai, *et al.* Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. Nature, v.415, n.6871, Jan 31, p.530-6. 2002.

Verona, R. I., M. R. Mann, *et al.* Genomic imprinting: intricacies of epigenetic regulation in clusters. Annu Rev Cell Dev Biol, v.19, p.237-59. 2003.

Virnig, B. A., T. Shamlivan, *et al.* Diagnosis and management of ductal carcinoma in situ (DCIS). Evid Rep Technol Assess (Full Rep), n.185, Sep, p.1-549. 2009.

Virnig, B. A., T. M. Tuttle, *et al.* Ductal carcinoma in situ of the breast: a systematic review of incidence, treatment, and outcomes. J Natl Cancer Inst, v.102, n.3, Feb 3, p.170-8. 2010.

Vu, T. H. e Z. Werb. Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology. Genes Dev, v.14, n.17, Sep 1, p.2123-33. 2000.

Waddington, C. The Epigenotype. Endeavour, v.1, p.18-20. 1942.

Wang, Z., C. Zang, *et al.* Combinatorial patterns of histone acetylations and methylations in the human genome. Nat Genet, v.40, n.7, Jul, p.897-903. 2008.

Warri, A., Saarinen, Nm, Makela, Si. Can modulation of mammary gland development by dietary factors support breast cancer prevention? Hormone Research, v.v.168, p.248-260. 2007.

Weigelt, B., J. L. Peterse, *et al.* Breast cancer metastasis: markers and models. Nat Rev Cancer, v.5, n.8, Aug, p.591-602. 2005.

Widschwendter, M., G. Jiang, *et al.* DNA hypomethylation and ovarian cancer biology. Cancer Res, v.64, n.13, Jul 1, p.4472-80. 2004.

Woodward, W., Chen, Ms, Behbod, F, Rosen, Jm. On mammary stem cells Journal of Cell Science, v.v.118, p.3585-3594. 2005.

Woolley, D. E., R. W. Glanville, *et al.* Purification of rheumatoid synovial collagenase and its action on soluble and insoluble collagen. Eur J Biochem, v.54, n.2, Jun, p.611-22. 1975.

Wu, Z. S., Q. Wu, *et al.* Prognostic significance of MMP-9 and TIMP-1 serum and tissue expression in breast cancer. Int J Cancer, v.122, n.9, May 1, p.2050-6. 2008.

Xiong, Y., S. C. Dowdy, *et al.* Opposite alterations of DNA methyltransferase gene expression in endometrioid and serous endometrial cancers. Gynecol Oncol, v.96, n.3, Mar, p.601-9. 2005.

Yamamoto, H., Y. Adachi, *et al.* Association of matrilysin expression with recurrence and poor prognosis in human esophageal squamous cell carcinoma. Cancer Res, v.59, n.14, Jul 15, p.3313-6. 1999.

Yoder, J. A., C. P. Walsh, *et al.* Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites. Trends Genet, v.13, n.8, Aug, p.335-40. 1997.

Yokoyama, M., K. Ochi, *et al.* Matrix metalloproteinase-2 in pancreatic juice for diagnosis of pancreatic cancer. Pancreas, v.24, n.4, May, p.344-7. 2002.

Zhang, B., X. Cao, *et al.* Tumor-derived matrix metalloproteinase-13 (MMP-13) correlates with poor prognoses of invasive breast cancer. BMC Cancer, v.8, p.83. 2008.

Zucker, S., M. Hymowitz, *et al.* Measurement of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in blood and tissues. Clinical and experimental applications. Ann N Y Acad Sci, v.878, Jun 30, p.212-27. 1999.

ANEXO 1: TERMO DE CONSENTIMENTO

Concordo em participar livremente deste estudo, entendendo que serei entrevistado e submetido a uma avaliação laboratorial (exame de sangue). E, entendendo que os riscos de minha participação nesta pesquisa são mínimos.

Entendo que minha participação é inteiramente voluntária, podendo me recusar a responder qualquer questão ou retirar o meu consentimento em participar neste estudo a qualquer hora, sem nenhum prejuízo ao meu tratamento atual ou futuro.

Eu, _____, após ter lido e entendido todas as informações e esclarecido todas as minhas dúvidas referentes a este estudo, concordo voluntariamente em participar do mesmo. Atesto também o recebimento das “informações do doador”, necessário para a minha compreensão do estudo.

_____ Data __/__/__
Assinatura (do doador ou responsável) ou impressão datiloscópica

Eu, Prof. Dr. Iglénir João Cavalli, declaro que forneci todas as informações referentes ao estudo do doador.

_____ Data __/__/__
Prof. Dr. Iglénir João Cavalli